

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Regulación de ureasa en *Parmelia Roystonea* Vicente &
Xavier Filho y *Cladonia Verticillaris* (Raddi) Fr.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

L. Xavier Filho

DIRECTOR:

Carlos Vicente Córdoba

Madrid, 2015

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T582.29

BIBLIOTECA UCM



5306702343

FIL

reg

Regulación de Ureasa en *PARMELIA ROYSTONEA*

Vicente & Xavier Filho y

CLADONIA VERTICILLARIS (Raddi) Fr.

TESIS DOCTORAL

por

LAURO XAVIER FILHO



R. 23.302

MADRID, 1978

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

"REGULACION DE UREASA EN PARMELIA ROYSTONEA VICENTE &
XAVIER FILHO Y CLADONIA VERTICILLARIS (RADDI) FR."

MEMORIA

que para optar al DIPLOMA DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS presenta

LAURO XAVIER FILHO

Madrid, 1978.

El trabajo experimental que presento como tesis para aspirar al diploma de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba, a quien quiero expresar mi agradecimiento ya que sin su ayuda, enseñanzas y orientaciones no hubiera sido posible este trabajo.

Igualmente quiero agradecer la ayuda y valiosas sugerencias de la Dra. María Pilar Estevez de quien debo también hacer constar el apoyo que en todo momento ha prestado a mi trabajo; a la Dra. Rosalía Ramírez Vera, por amable acogida y ayuda y el interés mostrado a lo largo del trabajo.

También deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros, Arantza Azpíroz, Milagros Maseo, María Teresa Rodríguez, Matilde Climent, Isabel Martín y a todos aquellos que de algún modo me han prestado su ayuda. Al Sr. Claudio Macias Rodríguez por su ayuda técnica en la parte de preparación de cuadros, gráficos, fotografías y dibujos.

Al Prof. Dr. D. Alfredo Carrato y al Dr. D. Joaquín Fernández, su valiosa colaboración en la prepara-

ción de muestras de líquenes en el microscopio de barrido.

Deseo expresar mi agradecimiento a Doña Rosa Manza-
nares por la ayuda en la diagnosis latina de la nueva espe-
cia de Parmelia.

Este trabajo ha sido realizado con una beca de la
"CAPES" y de la Universidad Federal de Pernambuco, a quien
también quiero expresar mi agradecimiento.

A mi abuelo Aníxio Borges Monteiro de Melo, el cual en mi niñez me puso el apodo de Doctor, le doy mi eterna gratitud.

A mis padres, Lauro y María (Fulô), que supieron legar la modestia, el estímulo, la comprensión, el amor y el entendimiento, mi más profundo reconocimiento.

A mi querida Ana, esposa y madre que siempre me dió calma en la hora del desespero, me animó en la hora del desaliento físico y mental, supo soportarme y estimularme en los momentos de desanimo y ansiedad. A los pequeños Ana Margarida y Lauro Neto, que sin entender mucho "el poque de la vida", mis más sinceros agradecimientos por haber sabido hacerme la existencia tan feliz.

A Verá (Nenem) mi única hermana y compañera de infancia no podría en esta hora dejar de tener una palabra de amor y agradecimiento, apesar de los años en que la infancia nos separó.

INDICE

1. INTRUDUCCION	1
1.1. Definición de simbiosis liquénica	1
1.2. Regulación metabólica del talo liquénico .	5
1.2.1. Regulación metabólica del ficobionte ...	7
1.2.1. Regulación metabólica del micobionte ...	12
1.2.3. Otros aspectos de la regulación metabó- lica de los líquenes	19
1.3. Objetivo de la memoria	23
1.3.1. Localización geográfica de <u>Parmelia</u> <u>roystonea</u> y <u>Cladonia verticillaris</u>	24
1.3.2. Condiciones ambientales y fitosocioló- gicas en <u>Parmelia roystonea</u> y <u>Cladonia</u> <u>verticillaris</u>	28
1.3.3. El sistema urea-ureasa y su regulación por sustancias liquénicas.....	41
1.3.4. Finalidad de la memoria	44
2. MATERIALES Y METODOS	45
2.1. Organismos utilizados	45
2.2. Condiciones de cultivo	46
2.3. Purificación de sustancias liquénicas	47
2.4. Determinación de sustancias liquénicas ...	52

	Página
2.4.1. Método de coloración	53
2.4.2. Método de microcristalización	54
2.4.3. Método de valoración de sustancias li- quénicas	56
2.5. Preparación del extracto libre de células	66
2.6. Valoración de proteínas	70
2.7. Valoración de la actividad ureásica	70
2.8. Purificación de ureasa	71
3. RESULTADOS	73
3.1. <u>Parmelia roystonea</u>	73
3.1.1. Determinación de la nueva especie	73
3.1.2. <u>Parmelia roystonea</u> Vicente & Xavier Filho sp. nov.	77
3.1.3. Diagnósis latina	86
3.1.4. Síntesis de ureasa	92
3.1.5. Evolución de sustancias líquénicas	95
3.1.6. Efecto de sustancias líquénicas sobre actividad ureásica	100
3.1.7. Determinación de agregados	101
3.1.8. Localización del enzima	110
3.2. <u>Cladonia verticillaris</u>	125
3.2.1. Descripción de la especie	125
3.2.2. Síntesis de ureasa	125

3.2.3. Evolución del ácido fumarprotocetrárico	131
3.2.4. Purificación y caracterización de la ureasa	134
3.2.5. Efecto sobre actividad enzimática	136
3.2.6. Formación de agregados	136
3.2.7. Localización del enzima	139
4. DISCUSIÓN	143
5. CONCLUSIONES	158
6. BIBLIOGRAFÍA	160

1. INTRODUCCIÓN.

1. 1. - Definición de simbiosis liquénica.

Los líquenes constituyen un grupo de vegetales comunes a los naturalistas y prácticamente un grupo vegetal ignorado por la mayor parte de la gente.

Muchos autores de la antigüedad ya describieron los líquenes sin saber realmente que eran seres simbióticos.

Se sabe mientras tanto, que Theophraste en el siglo IV a.C., confundía los líquenes con las Hepáticas. Fué en 1694 cuando Tournefort (1) distinguió por primera vez los grupos de Hepáticas, Musgos y Líquenes. A su vez, Linné aplicó, en 1753, el sistema nomenclatura binaria y dividió los líquenes en siete clases, considerando, ya en esta época, las algas como responsables de la dualidad liquénica. Acharicus separó en siglo XIX, definitivamente, los líquenes de otras criptógamas y fué entonces cuando nació el vocabulario "liquenología" como una ciencia que perdura desde aquella época hasta nuestros días. En 1825 Wallroth, estudiando con más detalles los líquenes, denominó por primera vez "gonidias" a las células de algas y hongos y

las definió como células análogas de las algas que sirven para la reproducción de los líquenes.

En 1866, De Bary emitió la hipótesis de la dualidad de los constituyentes de los líquenes en consonancia con la presencia de algas y hongos en el interior del talo.

Al año siguiente Schwendener, tuvo el mérito de desarrollar la teoría de la dualidad líquénica, que por su valor mereció el nombre de "shwendenerismo". Mientras tanto, la oposición de otros investigadores fué inmediata y a veces violenta. El "schwendenerismo" recibió valiosos argumentos favorables por parte de sus defensores. Dangeard estudiando la citología de las hifas, concluye identificando las primeras como algas y los segundos como hongos. Bornet, en un trabajo clásico, investiga el modo de unión entre los dos simbiontes y confirma la penetración de verdaderos haustorios en las células verdes (2). Bonnier resintetiza líquenes colocando esporas de hongos y algas correspondientes para intentar la resíntesis líquénica.

Los trabajos de investigación realizados en torno a los líquenes fueron numerosos y muy variados a partir de 1900. Inicialmente los trabajos fueron numerosos en relación con la anatomía y sistemática. Hue y

Harmand, entre otros, trabajaron en la liqueno-flora francesa. Zahlbrückner (3) profundizó en los trabajos de sistemática, conservando su valor incluso en la actualidad. Existen pocos estudios en torno de la fisiología de los líquenes; no obstante podemos destacar los trabajos de H. Jumelle (4). Es posible que el primer trabajo en fisiología de líquenes fuera el de De Candolle 1798, concerniente a la absorción de la agua por Cladonia pyxidata (5), antes mismo de definirse líquenes como entidad unitaria.

Los diversos aspectos de la biología y de la bioquímica de los líquenes fueron mucho más frecuentes.

Solamente en la actualidad encontramos que los estudios de la biogeografía, ecología y fitosociología son más numerosos y definitorios en el campo de la liquenología.

Existen muy pocos documentos sobre como eran los líquenes en el transcurso de la historia, pues sus "tejidos" se prestan muy mal a la fosilización (6). Su existencia es dudosa en la era primaria y en la secundaria. No obstante, restos bastantes netos han sido encontrados en los depósitos terciarios de lignito de Renania y muy netos en el ámbar del Báltico (7). Ade-

más Sernander (8) ha identificado el estado "subfósil" de Cladonia del grupo rangiferina y Cetraria islandica en las turbas cuaternarias del Norte de Europa. Todos estos restos pertenecían pues a tipos variados de ascolíquenes, y se puede, además, afirmar que este grupo presentaba desde el terciario una diversificación tal que parecía probable que todos los hongos ascomycetes fuesen susceptibles de ser liquenizados entrado ya en simbiosis en esta época. Este grupo de líquenes, tal como lo conocemos actualmente, no aportaría novedades de una manera general por parte de los hongos, pero sí de la evolución de los troncos terciarios.

Estos troncos no son pues, una vía definitiva al mundo vegetal, ya que la antigüedad de su diversificación al mundo vegetal, es equivalente a la de la flora actual.

Sin embargo, en lo que concierne a los basidiolíquenes, faltan por completo documentos comprobatorios y no se puede determinar su antigüedad.

1. 2. - Regulación metabólica del Talo Liquéxico.

Todas las investigaciones en fisiología encuentran en los líquenes mayores dificultades que en cualquier otro grupo de plantas. La meta de cada observación de líquenes, claro está que no consiste solamente en averiguar el comportamiento de un organismo en particular, sino en interpretar las manifestaciones de vida de dos simbios (alga y hongo), que se influyen de manera recíproca continuamente. El ficobionte y el micobionte (6) coinciden plenamente con algas y hongos que viven libremente en los rasgos esenciales de su comportamiento; sin embargo, determinadas adaptaciones fisiológicas a la situación de la simbiosis son prácticamente imposibles de detectar. Las investigaciones sobre el transporte de sustancias entre los colaboradores es un ejemplo del gran número de problemas que resultan del dualismo de los talos líquénicos.

Todas las investigaciones de este tipo van unidas a grandes dificultades técnicas. Sin embargo, es perfectamente posible cultivar y examinar los dos simbios por separado; pero, como podremos observar, sus

formas de comportamiento fisiológico difieren claramente del comportamiento dentro del liquen. En la mayoría de los casos, solamente se pueden obtener resultados válidos cuando los experimentos son efectuados sobre el talo del liquen intacto. Se ha conseguido en los últimos años desarrollar en creciente medida los necesarios métodos de investigación para estas observaciones.

El hecho de ser prácticamente imposible mantener vivos a líquenes durante largo tiempo en un laboratorio dificultan notablemente los experimentos prolongados (9). El equilibrio fisiológico es tan inestable que el talo se desintegra rápidamente la mayoría de las veces. La mayor parte de las investigaciones sobre el metabolismo de los líquenes es, por tanto, llevada a cabo con ejemplares recién colectados, de cuyo talo se perforan discos de igual tamaño con un taladro (10). Los resultados de estos intentos, junto con las observaciones en simbiontes aislados, han dado últimamente una creciente imagen unitaria de la fisiología de los líquenes. A pesar de todas las dificultades metodológicas, podemos decir que estos organismos simbióticos han sido mejor investigados que las demás simbiosis vegetales.

1. 2. 1. - Regulación metabólica del ficobionte.

A pesar de todos los intentos realizados con líquenes, continua no estando muy claro si los ficobiontes de líquenes se diferencian en principio de las algas que viven libremente. Las algas que viven en simbiosis difieren en forma y comportamiento de los ejemplares que viven libremente.

Las algas de la especie Trebouxia, que constituyen uno de los más frecuentes ficobiontes de los líquenes poseedores de algas verdes, tienen, por ejemplo, contornos más afilados, agudos y células más grandes fuera del talo del líquen. Las algas azules también cambian de forma en el líquen.

Las algas filamentosas se transforman frecuentemente de tal manera en el líquen que resulta casi imposible reconocerlas. Las algas verdes se reproducen en el talo del líquen por medio de una sencilla separación de células y con la ayuda de aplanosporas. En algas aisladas y en medios líquidos de cultivo se pueden observar gametos y zoosporas móviles.

Todas las diferencias hasta ahora mencionadas no separan en principio las algas de los líquenes de sus parientes que viven libremente, ya que desaparecen nueva

mente todas las peculiaridades en el cultivo de los ficobiontes aislados.

Por lo tanto, las divergencias no son fijadas genéticamente, sino que son ocasionadas por las influencias de los modos simbióticos de vida. Por el contrario, otras características de las algas no desaparecen en cultivos artificiales. En general, las algas aisladas conservan la vida lenta, lo cual es característico de los ficobiontes en el liquen. El lento desarrollo de las algas en el liquen es ciertamente una acomodación a la simbiosis. Dado que la fotosíntesis de los líquenes no es de ningún modo menor, inferior, al de las algas que viven libremente, los ficobiontes pueden ceder durante su vida grandes cantidades de hidratos de carbono a los micobiontes (11).

Los líquenes están capacitados para una vida autotrófica. No son necesarias vitaminas para su desarrollo en medio de cultivos (12) y (13). Los intentos de influir en la vida de algas cultivadas a través de extractos de micobiontes, han tenido éxito en algunos casos. El desarrollo de Trebouxia es claramente favorecido por hidratos de carbono y por compuestos orgánicos de nitrógeno (14). Este alga puede vivir en una solución alimen

ticia portadora de glucosa e incluso en oscuridad. El desarrollo de las algas en cultivo bajo régimen quimio ergónico es mucho más rápido, aunque puedan encontrarse oscilaciones o fluctuaciones relativamente grandes. Es interesante observar las condiciones de vida óptimas difieren frecuentemente de los correspondientes valores de los ficobiontes. Un valor pH de 4,0 - 7,4 es óptimo para Trebouxia (15), (16) y uno de 6,0 - 9,9 lo es para Nostoc (17).

Los ficobiontes aislados son, la mayoría de las veces, relativamente sensibles a las altas intensidades de luz y de esta forma se igualan a la mayor parte de las algas que viven libremente (14), (15) y (18). Las algas de vida libre poseen casi siempre mecanismos propios de protección contra intensas radiaciones de luz. Dado que las hifas de la corteza protegen a los ficobiontes, las propias posibilidades de defensa dejan de desarrollarse completamente. Trebouxia, del líquen Xanthoria parietina, posee, en comparación con las algas que viven libremente, menos β -carotenos en relación a la cantidad de clorofila (19). Se considera como válido el papel que los carotenoides juegan en la protección de las algas contra excesivas cantidades de luz (20) y (21).

La sensibilidad a la temperatura y sequedad también es muy variada.

Un ficobionte de Cladonia convoluta recién aislado puede soportar, por ejemplo, una temperatura de hasta 90° C mientras que después de 9 semanas de período de cultivo está tan deteriorado que podría decirse que una temperatura de 70°C es letal. El alga Coccomyxa de Solorina saccata, después de un período de cultivo de 9 semanas, todavía puede resistir un período de sequedad de 5 semanas, mientras que en el líquen soporta un período de 23 semanas de sequedad.

El transporte de sustancias entre los dos colaboradores es de gran importancia para el entendimiento de la simbiosis. Es de suponer que los líquenes en cultivo cedan sustancias al medio, (22) las cuales son normalmente cedidas asimismo a los micobiontes.

Nostoc, de Collema tenax, expulsa al medio, por ejemplo, el 5% de nitrógeno que fija del aire. Al mismo tiempo se excretan los polisacáridos y las vitaminas - tiamina, biotina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico (23). En otras investigaciones se vió cómo una alga Coccomyxa, de Peltigera apthosa, cedía al medio de cultivo 16 veces tanta biotina como una Chlorella pyrenoidosa de vida libre. La expulsión de hidratos de carbono también parece ser extraordinariamente eleva

da, por lo menos en algas recién aisladas. Nostoc, de Peltigera polydactyla, segrega al medio de cultivo gran cantidad de ¹⁴C. Solamente se pudo fijar en las células de las algas muy poca cantidad de uniones insolubles de ¹⁴C. Después de algunos días, la fuerte excreción disminuye (24). Las observaciones insinúan que al final la permeabilidad de las células de las algas se vea modificada por la influencia del hongo.

Según experimentos muy recientes, no es seguro que los intentos realizados con ficobiontes recién aislados admitan conclusiones demasiadas claras sobre los líquenes.

1. 2. 2. - Regulación metabólica del micobionte.

El micobionte de la mayoría de los líquenes se puede aislar y mantener en cultivo fácilmente; tanto el agar como los medios líquidos son apropiados para el cultivo. En los medios de cultivos líquidos, los hongos forman, la mayor parte de las veces, una masa viscosa de micelio, o si no unos filamentos sueltos, mientras que, en general, en el agar forman micelios compactos. El ambiente de los cultivos puede variar considerablemente. En algunos intentos, se pudo observar el comienzo de una articulación, división, en los tejidos del micelio (25). En todo caso las colonias de hongos nunca se parecen claramente al talo del líquen, del cual fueron aislados.

El desarrollo de un talo normal sin el colaborador de la simbiosis no parece ser posible. En casos excepcionales, los micobiontes aislados siempre pueden tener capacidad de formar órganos de reproducción en el cultivo. Bajo estas condiciones se pudieron observar repetidas veces picnidios y conidios. En un caso concreto, apareció incluso un apotecio, el cual naturalmente no alcanzó la madurez (14).

Los micobiontes aislados crecen mucho más lentamen-

te que la mayoría de los hongos que viven libremente. Un hongo de líquenes que crezca rápidamente puede alcanzar en un cultivo de agar, en cuestión de un mes, un diámetro de 1 a 2 cm. En la mayoría de los casos, el aumento mensual supone, en todo caso, solamente 1 ó 2 mm. En un medio líquido pueden alcanzar en 25 ml de líquido de cultivo aproximadamente 100 g de peso seco como máximo (26). Por el contrario, de los cultivos de Aspergillus o de Penicillium se puede esperar aproximadamente el cuádruplo de la cantidad ya mencionada. En la mayoría de los hongos de líquenes, el aumento de un cultivo líquido va parando lentamente después de unas 5 o 6 semanas (26) y (17).

Algunos micobiontes pueden aprovechar diversas fuentes de nitrógeno en el cultivo. No se puede constatar una preferencia general por determinadas asociaciones. Asociaciones orgánicas e inorgánicas hacen posible un crecimiento igualmente bueno. Con lo que mejor se desarrolla el micobionte de Acarospora fuscata es con KNO_3 , mientras que el de Cladonia cristatella prefiere L-alanina (27).

Otros nutrientes que pueden ser bien aprovechados son, por ejemplo, sales de amonio, peptona y urea. La ma-

yoría de los aminoácidos por ejemplo: L - prolina, L - alanina, L - arginina, L - ácido glutámico, L - ácido aspartico, pueden ser bien aprovechados (28) y (29).

La preferencia de un hongo por una determinada fuente de nitrógeno depende también de la composición del medio de cultivo. El micobionte de Xanthoria parietina puede aprovechar, por ejemplo, una gran cantidad de asociaciones de nitrógeno si, en lugar de sacarosa, tiene pectina como hidrato de carbono (30). El tipo de fuente de nitrógeno puede modificar las características del micobionte en el cultivo. La formación de conidios en el micobionte de Buellia stillingiana puede verse obstaculizada por el ácido glutámico, por la urea o por la caseína (31). Un tipo norteamericano de Bacidia puede formar un pigmento amarillo utilizando nitrato amónico y glicina. Por el contrario, dificultan la formación del pigmento el tartrato de amonio y el ácido glutámico.

La mayoría de los micobiontes, en su suministro con elementos orgánicos, no son ordenados en determinadas sustancias. Casi todos los disacáridos, celulosa, maltosa, lactosa, frutosa, manosa, ramnosa, sorbosa, pueden ser bien aprovechados. Algunos polisacáridos como la dextrina, dextrana y pectina dan buenos resultados, mientras

que la celulosa y el almidón son menos apropiados. Otros azúcares, alcoholes y ácidos del ciclo glioxílico dan de manera diferente buenos resultados (14).

De forma análoga a la del suministro de nitrógeno, los diversos hidratos de carbono puede modificar también la forma y las características de los hongos; por ejemplo, el micobionte de Graphina bipartita forma con lactosa un pigmento amarillo (27). En estos cultivos, sus hifas están envueltas en una gruesa vaina gelatinosa y están densamente guarnecidas con cristales rojos. Por otra parte, en un medio de cultivo que contenga maltosa, el pigmento del hongo será amarillo más oscuro. Los cristales están presentes y, bajo estas condiciones, la vaina gelatinosa se desarrolla más debilmente. En un medio de cultivo que contenga sacarosa, las células del hongo son perjudicadas. Ellas están rodeadas por una gran vaina gelatinosa, pero no producen ni pigmento ni cristales. En el caso de Acarospora fuscata, la dextrosa estimula la producción de un pigmento marrón (32). La glucosa es necesaria para la síntesis de parietina por el micobionte de Xanthoria parietina.

Muchos micobiontes necesitan un suministro de vitaminas en el medio de cultivo. La mayoría de los tipos

examinados necesitan para su crecimiento, por lo menos, tiamina y biotina. Por ejemplo los micobiontes de Acarospora fuscata, Lecidea decipiens, Stereocaulon apthosa (27), (33) y (26). El colaborador del hongo de Sarcogyne similis puede no tener tiamina, pero está cargado de biotina, mientras Collema tenax puede prescindir de la biotina, pero nunca de la tiamina (17). Como hemos podido observar en el comentario sobre regulación metabólica del ficobionte, ambas vitaminas son producidas abundantemente por los ficobiontes y cedidas a la solución alimenticia. El hongo puede, por lo tanto, ser suplementado con vitaminas a través del alga, en el estado de simbiosis. En general, el crecimiento de un micobionte, aislado se ve estimulado por un extracto de algas (17) y (13).

El ácido indol-3-acético (4-16 mg/l) dificultó en algunos experimentos el crecimiento del micobionte, mientras que el ácido giberélico (5-10 mg/l) no tuvo ningún efecto (34) y (35). El efecto negativo del indol-3-acético puede ser debido a la alta concentración.

Los micobiontes son claramente dependientes del valor pH del medio de cultivo. Las condiciones óptimas

varían para los diversos tipos de hongos. El valor p H más favorable para Collema tenax está en 6,2, para Xanthoria parietina en 5,6 - 6,4, para Sarcogyne similis en 5,0, para Buellia stillingiana en 4,5 y para Umbilicaria papulosa 2,0 (16) y (17). El crecimiento del hongo disminuye si hay un pH desfavorable en el medio de cultivo.

Por otra parte, el valor de pH también puede tener influencia sobre la diferenciación de un hongo. El micobionte de Buellia stillingiana solamente forma conidios, cuando el pH del medio está entre 5 y 7 (31).

Los hongos, como organismos quimioergónicos, son relativamente independientes de la luz. Esto es válido también para los micobiontes. Collema tenax forma caratenoides bajo una intensa iluminación, los cuales colorean las colonias de rojo (37). Las informaciones acerca del perjuicio que sufren los micobiontes aislados a consecuencia de la luz solar directa se basan probablemente en la fuente de calor de los cultivos (14). En general, el crecimiento miceliar de los hongos aislados se ve influido bien por la luz continua, bien por iluminación interrumpida.

La temperatura tiene una clara influencia sobre

el crecimiento de los micobiontes. La temperatura óptima para la mayoría de las especies oscila entre 15 y 20°C. Este valor es significativamente más bajo que para muchos hongos no liquénicos. La sensibilidad térmica varía en los distintos micobiontes (38). Por ejemplo, Baeomyces rufus se adapta mal a las oscilaciones térmicas. La curva óptima de esta especie muestra un aumento de micelio a 18°C. Por el contrario, Physconia pulverullenta es mucho menos sensible. La curva óptima en este organismo transcurre entre 9° y -21°C.

Los micobiontes pueden aguantar perfectamente temperatura bajas. El micobionte de Umbilicaria papulosa sobrevive a la inmersión en nitrógeno líquido (-197°C)(39). Si el hongo está seco o mojado no tiene ninguna importancia. La capacidad de resistencia al calor es, en todo caso, muy inferior a la del frío. En este caso, juega un papel decisivo el grado de hidratación del hongo con bajo contenido hídrico; el micobionte puede soportar una temperatura de 45°C positivos durante varias semanas sin ser perjudicado. Para alto contenido hídrico, por el contrario, su barrera de tolerancia solamente alcanza los 37°C positivos (40).

1. 2. 3. - Otros aspectos de la regulación metabólica de los líquenes.

El talo de la mayoría de los líquenes contiene grandes cantidades de diversos pigmentos y de sustancias líquénicas, los cuales solo se forman muy raramente en cultivos de hongos aislados. En cultivo de micobiontes de Xanthoria parietina, se forma el pigmento coloreado orgánico parietina y el micobionte de Candelariella vitellina sintetiza al anhídrido del ácido pulvínico (41). Mientras que estos dos hongos forman los mismos compuestos en el líquen que en cultivo, en otros micobiontes el comportamiento en cultivo parece ser diferente del de la simbiosis. El hongo de Cladonia cristallina sintetiza en un medio artificial un pigmento rojo, el cual no es idéntico al ácido rhodocladónico que normalmente colorea de rojo el líquen (27).

Los dépsidos o depsidonas que son característicos de la mayoría de los líquenes, no parece encontrarse, en general, en los cultivos de los hongos aislados. Los micobiontes aislados de las numerosas especies de los generos de Cladonia, Lacanora y Parmelia, no muestran ni trazos de estos compuestos (35). Antiguas investigaciones en las cuales fueron encontrados ácidos líquénicos en cultivos de mi

cobiontes, no pudieron ser reproducidos (42).

Ultimamente, se descubrieron en un cultivo del hongo de Ramalina crassa, ácido úsnico y ácido salacínico (43) y (44). Parece ser, que la formación de compuestos liquénicos depende notablemente de la temperatura. A 10° C el hongo sintetizó ambos compuestos, mientras que a 25° C solamente se formó ácido úsnico.

Dado que en algunos casos los hongos no liquénicos pueden sintetizar depsidonas, no se entiende cómo los hongos liquénicos aislados no son también capaces de ello. Por ejemplo, Aspergillus nidulans sintetiza nornidulina y nidulina. En los cultivos de micobiontes aislados se encontraron ácidos fenólicos monocíclicos (ácido orselínico y ácido hematómico), que a su vez son precursores de los dépsidos (35). Probablemente, debe tomarse como válido que las algas juegan un papel importante pero, en particular, todavía desconocido, en la síntesis de las sustancias liquénicas. La propia alga puede contener taninos, los cuales están químicamente emparentados con los dépsidos (45). En algunos casos se puede observar que el alga ejerce una evidente influencia sobre la formación de productos secundarios para el metabolismo del hongo. En el caso del líquen Herpothallon sanguinum, la simbiosis aún no está consolidada de manera

que el micobionte puede vivir saprofitico sin algas. El micobionte libre de algas está fuertemente coloreado de rojo. En algunas partes liquenizadas del talo desaparece la pigmentación roja bajo la influencia del alga.

Los talos liquénicos que están completamente empapados de agua, contienen un promedio entre 100% y 300% de su peso seco de agua. Estos valores son válidos tanto para líquenes foliosos como para arborescentes (31)(46). Los talos de los líquenes gelatinosos pueden contener, por el contrario, mayores cantidades de agua, ya que probablemente, las gruesas vainas gelatinosas de las algas contribuyen al almacenamiento. Los talos de Collema crispus totalmente empapados, contienen un 800% de agua, los de Collema cristatum un 1.400%, los de Leptogium lichenoides un 830% y los de una especie de Collema, hasta ahora no concretada, contienen un 1.300% de su peso seco de agua (47). Prescindiendo de estos líquenes gelatinosos, el máximo contenido de agua de los líquenes es menor que otras criptógamas epifíticas (48). El contenido mínimo de agua de los líquenes está, en la naturaleza, en 2-145% (31)(22). Al contrario de lo que ocurre en las plantas superiores, en los líquenes el agua no se acumula de forma intracelular. En los talos, la principal cantidad de agua se encuentra en

espacios huecos entre las hifas y en las paredes de las células del hongo (49).

La absorción de agua es en los líquenes un proceso pasivo y físico. La curva normal de absorción de los talos semeja a la de un gel higrófilo. En general, los líquenes absorben agua líquida muy rápidamente, en forma de lluvia o rocío. Al sumergir los talos en agua, más de la mitad de la máxima cantidad de agua es absorbida en menos de un cuarto del tiempo que es necesario para la total impregnación. A una temperatura de 20° C y con una humedad relativa del aire del 60%, el contenido de agua del talo impregnado de Umbilicaria polyphyla, decae en 6 horas hasta un 15% (46). Dado que, habitualmente, los líquenes en estado natural entran en contacto con agua líquida solo durante poco tiempo, la capacidad para una rápida absorción es naturalmente muy importante, dado que como podemos observar, el hecho de secarse rápidamente puede ser de forma circunstancial bastante importante dado que a través de esto se evitan los daños producidos por el calor y un balance de materia desfavorable.

En los líquenes no existen órganos determinados que controlen la absorción y la entrada de agua. Las rizinas de muchas especies recuerdan, por su forma, a órganos de absorción de agua o a vasos de agua de plantas superiores, pero solo en casos aislados desempeñan esta función.

1. 3. - Objetivo de la memoria.

El objetivo de la presente memoria fué estudiar la regulación de ureasa en líquenes no portadores de ácido úsnico. Los líquenes estudiados son:

Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris, siendo la primera una nueva especie para la ciencia. Ambas especies son de ámbito ecuatorial.

Hasta ahora se había investigado el papel del ácido úsnico sobre la regulación de ureasa en Evernia prunastri y Lobaria pulmonaria, especies productoras de esta sustancia liquénica.

Con el fin de dilucidar un papel regulador similar al del ácido úsnico en otras sustancias liquénicas, es por lo que se eligieron estas especies.

1. 3. 1. - Localización geográfica de Parmelia
roystonea y Cladonia verticillaris.

El Brasil está comprendido entre las latitudes de 5° 16' N y de 33° 45' S, estando localizada su mayor extensión en la zona intertropical, donde dominan los climas ecuatoriales y tropicales (50).

La mayor parte del territorio brasileño no es montañoso, sino plano o poco accidentado.

Brasil presenta grandes variedades de climas tropicales, desde latitudes ecuatoriales hasta latitudes subtropicales.


Las dos especies que estamos estudiando en la presente tesis están situadas en el Nordeste brasileño.

El Nordeste, zona saliente del territorio brasileño, la cual se proyecta sobre el Oceano Atlántico, se caracteriza sobre todo por su posición. Se trata de una gran región "semi-árida", dominada por la masa de aire ecuatorial atlántica. Está formada por "pediplano" cristalinos y por algunas capas sedimentarias, destacándose los "inselbergs", revestidos por una vegetación retorcida de "scrubs". Ríos temporales, seme

jantes a los "uedes", cortan a la región, que también presenta florestas húmedas y zonas aisladas (51).

Parmelia roystonea está situada más concretamente en el Estado de Pernambuco, que a su vez pertenece a la región nordeste. Dicho Estado está encuadrado entre las siguientes líneas extremas: N 7° 15' 45" de latitud S; 9° 28' 18" de longitud O de Greenwich (50) y (Figura 1).

Cladonia verticillaris está situada en el Estado da Paraíba, también perteneciente a la región nordeste brasileña. Sus líneas extremas son N 6° 02' 12" de latitud S; S, 8° 19' 18" de latitud S; E, 34° 45' 54" longitud O de Greenwich; O, 38° 45' 45" de longitud O de Greenwich (50). El punto más oriental de Brasil y de América del Sur está situado en Estado da Paraíba. Dicho punto es ponta Seixas o Cabo Branco (Figura 1).

Figura 1 - Mapa del Brasil ● local de colecta de Parmelia
roystonea,  y de Cladonia verticillaris.



1. 3. 2. - Condiciones ambientales y fitosociológicas en Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris.

Parmelia roystonea es una especie poco común en el nordeste brasileño. No obstante es abundante sobre Roystonea oleracea (Jacq.) Cook, vulgarmente llamada palmera imperial, pues fué introducida por el Emperador Pedro I en el Brasil hace más de medio siglo; es una de las más bellas y altas palmeras tropicales, llegando a alcanzar 50 metros de altura en las Antillas, su patria de origen. En el Brasil, ésta alcanza entre 35 y 40 metros de altura. De estipe elegante, por su altura, frondes pinnadas, grandes, regularmente palmeadas en curvas graciosas. Racimos adornado con pelos lanosos en sus ramas. Estambres de 6 - 12. Parece ser la especie más cultivada en el Brasil, para parques y jardines.

La especie de Parmelia que estamos describiendo como nueva para la ciencia, se encuentra sobre Roystonea oleracea, en parques y jardines de la ciudad de Recife-Pernambuco. Con las coordenadas de 8° 03' de latitud S y 34° 52' de longitud O de Greenwich (50). La ciudad se encuentra a 2 metros sobre el nivel del mar, y posee un clima AS según la clasificación de Köppen(51),

con lluvias abundantes, concentradas en el otoño-inviero, con 2.912 mm en los meses de julio-agosto, como promedio en los años de 1963 a 1973. La temperatura media máxima es de 28,8°C, siendo amenizada ésta por la brisa marina. La humedad relativa oscila alrededor del 80% como media anual.

El origen y crecimiento de la ciudad tuvo lugar a consecuencia de un depósito aluvial, compuesta de islas, penínsulas y manglares, envueltos por los brazos y meandros de los ríos Capibaribe, Beberibe y Tegipió, cuyas inundaciones constituyen un problema tradicionalmente relevante no solo ahora, sino también en los tiempos de colonización holandesa.

En Roystonea oleracea, encontramos juntamente con Parmelia roystonea, abundancia de Bromeliaceas del género Tillandsia, Cactaceas del género Rhipsalis y muchas otras Briofitas y Pteridofitas, debido al grado de humedad existente por la gran cantidad de agua encontrada en el estipe de la palmera. (Figura 2).

Parmelia roystonea posee un talo foliáceo bien adherido al sustrato.

En el caso Cladonia verticillaris, es una especie muy abundante en los "tabuleiros" de Paraíba, con las

Figura 2 - Habitat de Parmelia roystonea sobre Roystonea
oleracea.



coordenadas de 6° 30' de latitud S y 35° 55' de longitud O de Greenwich, donde el suelo tiene una topografía plana, suavemente inclinada hacia las partes más bajas.

Entre los geólogos se admite que los "tabuleiros" son mesetas que dan lugar a formación "Barreiras" y geomorfológicamente son planicies pocas extensas de altitudes variables entre muy pocos metros hasta 200 metros de altitud sobre el nivel del mar. El "tabuleiro" está limitado por la floresta tropical pluvial situada entre las colinas.

Las comunidades vegetales son el espejo del clima y del suelo. Las condiciones edáficas interfieren notablemente en la constitución florística y en la frecuencia de cada especie en las comunidades que se establecen bajo las mismas condiciones climáticas.

Las lluvias son frecuentes, por encima de los 1.800mm anuales, y generalmente llueve por lo menos nueve meses seguidos. Existe en período seco en el último trimestre del año, en el cual suelen caer lluvias esporádicas aunque muy fuertes. Se sabe que las lluvias en esos "tabuleiros", excavan y mueven el suelo que esté desnudo hasta cierta profundidad. Existe una emigración de elementos químicos hacia las capas más profundas, lo

/

cual implica la carencia de oligoelementos en los suelos. Algunas horas de insolación bastan para que la capa superficial se seque completamente y se vuelva móvil pudiendo existir incluso erosión eólica en ciertos lugares.

La flora de los "tabuleiros" típicos se presenta constituida generalmente por aglomerados de arbustos y árboles constituyendo islas de "moitas", en las cuales hay un microclima diferente, donde viven muchas Cladonias del "tabuleiro", entre ellas Cladonia verticillaris, que vive sobre humus (52) y (Figura 3).

Esas "moitas" no pueden ser catalogadas como elementos del "tabuleiro" o de la sabana típica, porque tanto florística como ecológicamente pueden transformarse en micro-florestas secundarias, mientras no sean atacadas por el fuego (Figura 4).

Las especies predominantes en estas "moitas" en el estrato arbustivo y herbáceo son: Ouratea fieldingiana Engl. Byrsonima cydoniaefolia Juss., Hancornia speciosa Gomes, Hirtella ciliata Mart. & Zucc., Curatella americana L., Anacardium occidentale L. Pera ferruginea Schott., Didymopanax marototoni Decne & Planch., Pithecolobium avaremotemo Mart., Guattarda platypoda DC. Maytenus obsusifolia Mart. Burmania capitata Mart.

Figura 3 - "Moitas" características de la vegetación del
"Tabuleiro", formación del humus.



Figura 4 - Habitat de Cladonia verticillaris en el suelo
arenoso del "Tabuleiro".



Hippeastrum psittacinum Herb. (Figura 5).

Las Cladonias viven sobre el humus existente en las "moitas", las cuales a su vez forman su propio follaje. (52).

Figura 5 - Cladonia verticillaris viviendo sobre humus.



1. 3. 3. - El sistema urea-ureasa y su regulación por sustancias liquénicas.

Hoy día se sabe que muchos líquenes son productores de ureasa (53)(54) enzima de especificidad muy restringida (55,56 y 57). La ureasa produce dióxido de carbono y amoníaco por hidrólisis de la urea



Fishbein et al. (58) describen la hidroxíurea como segundo sustrato del enzima.

Al demostrarse que Evernia prunastri y Lobaria pulmonaria sintetizan ureasa en forma activa cuando utilizan urea como sustrato (59,57 y 60), la hipótesis de Ahmadjian (14) parece cobrar visos de realidad. Tal hipótesis puede ser enunciada en los siguientes términos: un líquen, sometido a un período de hambre nitrogenada, puede movilizar la urea de reserva, hidrolizándola por medio de una ureasa en dióxido de carbono y amoníaco. El CO_2 aumentaría su tensión en las células del ficobionte lo que haría subir el nivel de carbohidratos fotosintetizados. Por otra parte, Syrett (61) ha demostrado que el amoníaco anula la barrera de permeabilidad que supone la membrana en células de Chlorella de vida libre. De esta

manera, un mecanismo que en líquenes proporcione simul
taneamente ambos productos, daría como resultado un al
to flujo de carbohidratos al micobionte y, por tanto,
un aumento en la cantidad de cetoácidos de origen res-
piratorio, que, con amoníaco, restablecerían los nive-
les de aminoácidos requeridos.

Sin embargo, el metabolismo respiratorio del mi
cobionte es muy limitado (62) de tal manera que tan
perjudicial puede el exceso como el defecto de carbohi-
dratos. Esto supondría que el flujo de azúcares al mi-
cobionte debe ser cortado cuando exceda las capacida-
des metabólicas descritas.

Vicente (63) supone que este papel regulador
puede ser asumido por los fenoles líquénicos. Tal supo-
sición vendría avalada por el hecho de que el L-usnato
sódico, según describen Manso y Vicente (64) es inacti-
vador de la ureasa de Proteus mirabilis. Vicente et al
(65) demuestran que tal inactivación se lleva a cabo
por un mecanismo de agregación, de tal manera que la u-
reasa nativa, de peso molecular 480.000, incrementa es
te peso al formarse puentes L-alanil - L-usnato - L-pro-
lil, presumiblemente entre diferentes subunidades. Es-

ta posibilidad podría involucrar monómeros de un peso molecular 16.000, (66) u oligómeros de peso molecular 80.000 (67). Las dos posibilidades han sido experimentalmente confirmadas (68), describiéndose, además, que la urea puede acelerar el proceso de inactivación ya que, por sí misma, puede causar grados diferentes de agregación.

La significación que este mecanismo puede tener in vivo ha sido puesta de manifiesto para Evernia prunastri (69), liquen productor de ácidos úsnicos. El talo, incubado sobre urea, adquiere altas actividades ureásicas mientras los ácidos úsnicos no superan una concentración de 0,87mg/g de talo fresco.

En condiciones ambientales que favorecen la acumulación en talo de concentraciones de ácidos úsnicos superiores a la señalada, como pueden condiciones de fuerte iluminación o períodos prolongados en obscuridad, la actividad ureásica decrece en cuanto los fenoles incrementan.

Este papel regulador de los ácidos úsnicos no puede generalizarse como mecanismo universal en el mantenimiento de la simbiosis líquénica, ya que muchos líquenes no son productores de tales ácidos.

1. 3. 4. - Finalidad de la memoria.

Fundamentalmente se estudió a partir de Parmelia roystonea Vicente & Xavier Filho de la familia Parmelia
cea y de Cladonia verticillaris de la familia Cladonia-
cea el comportamiento fisiológico con vista a la regu-
lación ureásica, dilucidando el papel regulador similar
al del ácido úsnico de otros fenoles liquénicos.

2. MATERIALES Y METODOS.

2. 1. - Organismos utilizados.

Se utilizaron dos líquenes para el estudio de la regulación ureásica no productores de ácido úsnico. El primero fué una Parmelia roystonea, una nueva especie para la ciencia. Dicha especie se encuentra sobre Roystonea oleracea en plazas y parques de la ciudad de Recife-Pernambuco-Brasil.

La otra especie utilizada fué Cladonia verticillaris, muy común en los climas tropicales viviendo sobre humus en los tabuleiros o cerrados que están distribuidos por toda América del Sur.

El material de la Cladonia Verticillaris procedía de los tabuleiros del Nordeste Brasileño, particularmente del Estado de Paraíba - Brasil.

2. 2. - Condiciones de cultivo.

Las muestras fueron enviadas del Brasil y colocadas en bolsas de papel, para evitar la contaminación y al mismo tiempo la desecación. En el laboratorio, las muestras fueron lavadas en agua destilada para evitar la contaminación de otros organismos y fueron retiradas las briofitas, que viven comunmente en comunidad con los líquenes.

Para un mejor estudio del metabolismo enzimático, se emplearon dos tipos de condiciones ambientales. Primer tipo: El material líquénico fué colocado en la obscuridad a una temperatura de 37°C y humedad saturante. Empleamos también como antimetabolitos, la actinomicina D, cicloheximida y cloranfenicol en las mismas condiciones. Segundo tipo: Se colocaron las muestras en una intensidad lumínica de $12.000 \text{ ergios/cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a una temperatura constante de 26 grados centígrados y humedad saturante. El material fue iluminado con tubos fluorescentes Philips Daylight de 40W.

En el caso de Parmelia roystonea cultivamos el material líquénico durante 6 horas en intervalos de dos horas en obscuridad y luz. En el caso de Cladonia verticillaris, cultivamos el material líquénico durante 10 horas, también en intervalos de dos horas en obscuridad y luz.

Muestras de 0,5 g de Parmelia roystonea y de 1,0 g de Cladonia verticillaris se mantienen flotando sobre 15 ml de una disolución de urea 40 mM en tampón fosfato 75mM de pH 6,9 en las condiciones de temperatura, humedad y luz descritas.

Cladonia verticillaris posee ácido fumarprotocetrárico, y para iniciar la investigación de la regulación ureásica, fué necesario sacar con acetona dicho ácido.

2. 3. - Purificación de sustancias liquénicas.

De los numerosos métodos de extracción de sustancias liquénicas, la mayor parte de ellos fueron establecidos por Zopf (70) y Asahina (71). Existen métodos individuales propios de las diferentes sustancias; se sabe, sin embargo, que casi todas las sustancias liquénicas son solubles en acetona. El contenido de los líquenes en sustancias liquénicas es del orden de 0,5 a 5% en peso; 50 a 100 grs. de talo liquénico son suficientes para obtener, en el extracto, una concentración adecuada para la purificación y revelado de compuestos por cromatografía. Para evitar la formación de otros solventes, debido a la presencia de ácidos grasos, una previa extracción por benzina hirviendo es suficiente y eficaz.

La cromatografía se realiza bien con extracto bruto, bien con sus productos de hidrólisis. En este último caso, pueden aparecer algunas dificultades por el hecho de que algunos ácidos liberados por la hidrólisis sufran una descarboxilación, incluso en las condiciones de tratamiento más adecuadas.

Sin embargo, la hidrólisis no es completa. Losdepsidos dan por hidrólisis simple ácidos fenocarboxílicos y lasdepsidonas, ácidos dicarboxílicos del tipo difenil eter.

La cromatografía en papel es muy empleada. En el caso de Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris, preferimos el papel Whatman no. 1 y revelamos con cloruro férrico al 3% para detectar los fenoles existentes en el extracto liquénico. La tabla 1 da los Rf correspondientes.

Antes de aplicar los reactivos sobre el papel o la celulosa, se hace primero un examen, sometiéndose siempre a luz ultravioleta. La mayoría de los ácidos liquénicos dan una buena fluorescencia (Tabla 2).

Utilizamos también celulosa MN 300 de Macherey y como disolventes en ambos casos, (papel y celulosa) n-Butanol-amoniaco-agua (3:1:1) y n-Butanol-acetona-agua (3:1:1) (Tabla 3).

Constamos que las luces ultravioletas de ondas medias son preferidas. Los mejores resultados se obtienen en 255 y

TABLA 1

Rf. de las sustancias cromatografiada en papel y reveladas en
cloruro férrico de Parmelia roystonea

Acidos liquénicos	n-butanol:amoniaco:agua 3:1:1	n-butanol:acetona:agua 3:1:1
Acido caperático	-	-
Acido lecanórico	0,68	0,86
Atranorina	0,63	0.66

TABLA 2

Identificación por fluorescencia de sustancias líquénicas de
Parmelia roystonea por cromatografía

Sistema de identificación	Acidos líquénicos		
	Lecanórico	Caperático	Atranorina
n-Butanol : amoniaco : agua 366 nm (3:1:1)	Rosa	Rosa pálido	Amarillo intenso
n-Butanol : amoniaco : agua 254 nm (3:1:1)	Rosa	Violeta	Amarillo
n-Butanol : acetona : agua 366 nm (3:1:1)	Rojo	Amarillo pálido	Azul claro
n-Butanol : acetona : agua 254 nm (3:1:1)	Violeta	Violeta sucio	Verde claro

TABLA 3

Rf. de las sustancias líquénicas cromatografiada en celulosa y revelada en U.V. de Parmelia roystonea

Acidos líquénicos	n-butanol:amoniaco:agua 3:1:1	n-butanol:acetona:agua 3:1:1
Acido caperático	0,94	0,94
Acido lecanórico	0,75	0,89
Atranorina	0,25	0,67

366 mm.

Purificamos los ácidos lecanórico, caperático y atranorina de Parmelia roystonea y el ácido fumarprotocetrárico de Cladonia verticillaris, por cromatografía de capa fina en celulosa y confirmamos los resultados por el método de coloración y microcristalización.

2. 4. - Determinación de sustancias líquénicas.

Después de las investigaciones de Zopf (70), cuando describió más de 150 nuevas sustancias líquénicas y describió las fórmulas empíricas y algunas propiedades, se desarrolló la nueva ciencia liquenológica. Algunos años después, Emil Fische en 1913 (72) sintetizó por primera vez el ácido lecanórico, que es considerado un dépsido. En 1954 Asahina & Shibata (73) dieron a conocer 80 sustancias líquénicas con sus respectivas fórmulas empíricas.

Muchas de las sustancias son conocidas hoy y casi completamente definidas, existiendo la posibilidad de aparición de nuevos compuestos sobre los ya existentes: depsidonas, dépsidos y dibenzofuranos. Se sabe que la mayoría de las sustancias descritas actualmente son fenólicas, con excepción de algunos pigmentos, comunes a muchas especies.

La primera síntesis en torno a la clasificación de sustancias líquénicas fue dada por Zopf (70) y luego modificada por Asahina y Shibata (73). Estas sustancias están divididas en series alifática y aromática.

Para la determinación preliminar de una sustancia líquénica, se aplican las técnicas de coloración y microcristalográficas, que fueron utilizadas en la presente tesis.

2. 4. 1. - Método de coloración.

El test de coloración fué descubierto por Nylander (74), que empleó inicialmente dos reactivos, coloreando los talos líquénicos con hipoclorito de calcio e hidróxido de potasio; convencionalmente se abrevia el primero con la letra C y el segundo con letra K. En algunos casos se empleó la mezcla de C y K y la denominó KC. Asahina (75) empleó algunos años más tarde la p-fenilendiamina que también la abrevió como P. Generalmente se habla de K positiva o negativa. Hoy en día existen ciertas pruebas y otros reactivos, empleados para identificar sustancias líquénicas. Otras alternativas para determinar fenoles en liquenología son los espectros de absorción ultravioleta, análisis de fluorescencia, etc..

Para Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris utilizamos los reactivos anteriormente mencionados para identificar las sustancias existentes en los talos liquénicos citados, puesto que necesitábamos identificar los ácidos liquénicos.

2. 4. 2. - Método de microcristalización.

Asahina (76) desarrolló en sucesivos trabajos un procedimiento que llamó microquímica o microcristalización, para demostrar la presencia de sustancias liquénicas con la intención de utilizarlo en la taxonomía, dispensando la especialización en química orgánica, para así poder estar al alcance de los botánicos sistemáticos, sirviendo para separar químicamente especies afines.

Damos una idea del procedimiento: se coloca un fragmento del talo liquénico sobre un portaobjetos y se trata con solventes orgánicos volátiles, gota a gota, principalmente con cloroformo o acetona, evitándose agregar excesiva cantidad; si no, la solución resultante de la sustancias liquénicas se esparcería en un área demasiado extensa. Después de sucesivas aplicaciones se retira el trozo del talo liquénico, dejando un extracto seco del mismo. Acto seguido una serie de solventes normalizados serán experimentados

sobre las materias anteriormente extraídas, con lo que algunos de los compuestos existentes cristalizan en formas reconocibles en el microscopio.

Las soluciones empleadas por Asahina son las siguientes:

G.A.W. - partes iguales de glicerina, alcohol y agua.

G.E. - una parte de glicerina y tres de ácido acético.

G.A.Py.- una parte de glicerina, dos de alcohol y una de piridina.

G.A.Q. - dos partes de glicerina, dos de alcohol y una parte de quinolina.

G.A.An.- dos partes de glicerina, dos de alcohol y una de anilina.

G.A.oT.- dos partes de glicerina, dos de alcohol y una de o-Toluidina.

Colocadas éstas encima del residuo, la lámina se calienta ligeramente y se lleva al microscopio; los cristales obtenidos serán comparados con los de sustancias conocidas.

En el caso de Parmelia roystonea encontramos, utilizando el citado método, los ácidos lecanórico, caperáti

co y atranorina. En Cladonia verticillaris solamente encontramos ácido fumarprotocetrárico, cosa que ya se conocía a través de la literatura existente (77).

2. 4. 3. - Método de valoración de sustancias líquénicas.

Para valorar los ácidos lecanórico, caperático y atranorina, utilizamos sustancias líquénicas puras, pues cada una de ellas poseen espectros característicos en la zona del ultravioleta (Figuras 6, 7, 8 y 9). Los espectros ultravioletas correspondientes a cada una de las sustancias anteriormente mencionadas fueron medidos en disoluciones etanólicas de 3,3 mg/ml.

El coeficiente de extinción fué escogido basándose en las concentraciones posibles que dan la máxima atenuación en las variaciones, dado que existe una notable bajada para toda la gama de concentraciones ensayadas, oscilando entre 0,33 mg/ml y 3,3 mg/ml. Como longitudes de onda críticas fueron escogidas: 256, 274, 286 nm que presentan la máxima densidad óptica con menor índice de solapamiento.

Las concentraciones de 0,33 mg/ml y de 3,3 mg/ml dieron los resultados presentados en la tabla 4.

Figura 6 - Espectro de absorción de ácido lecanórico.

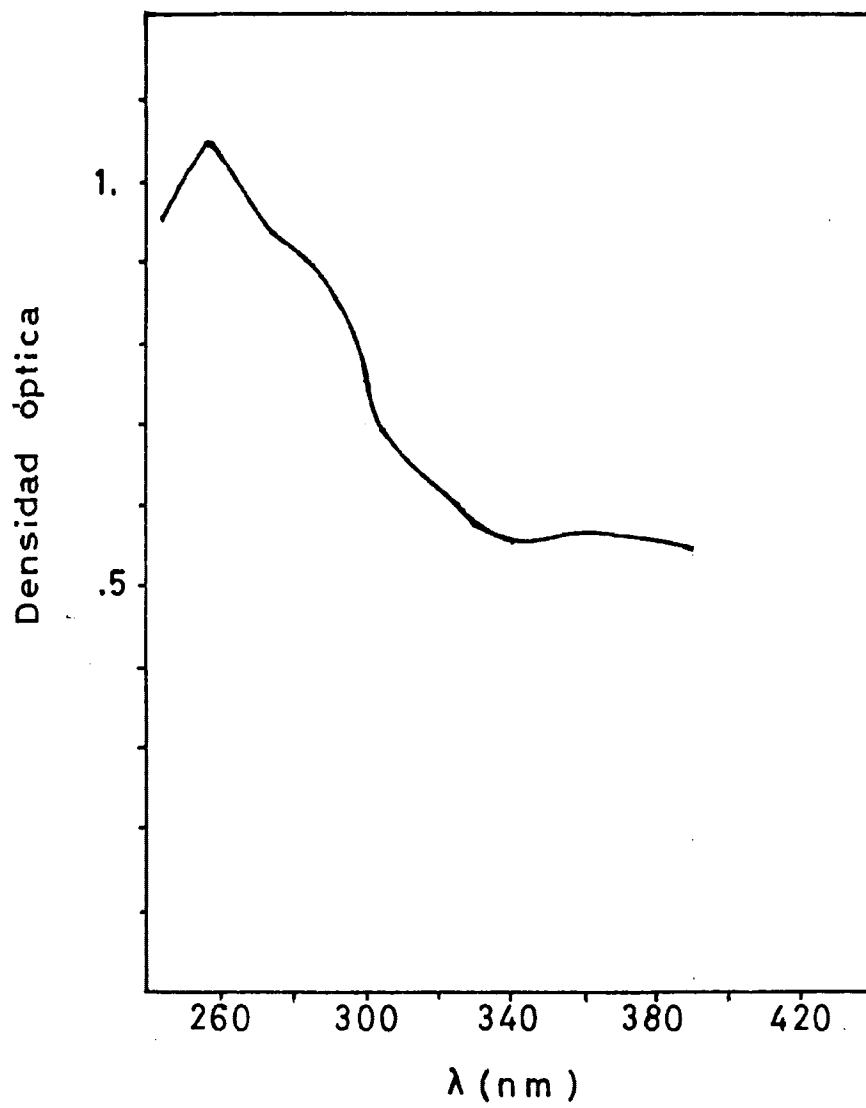


Figura 7 - Espectro de absorción de ácido caperático.

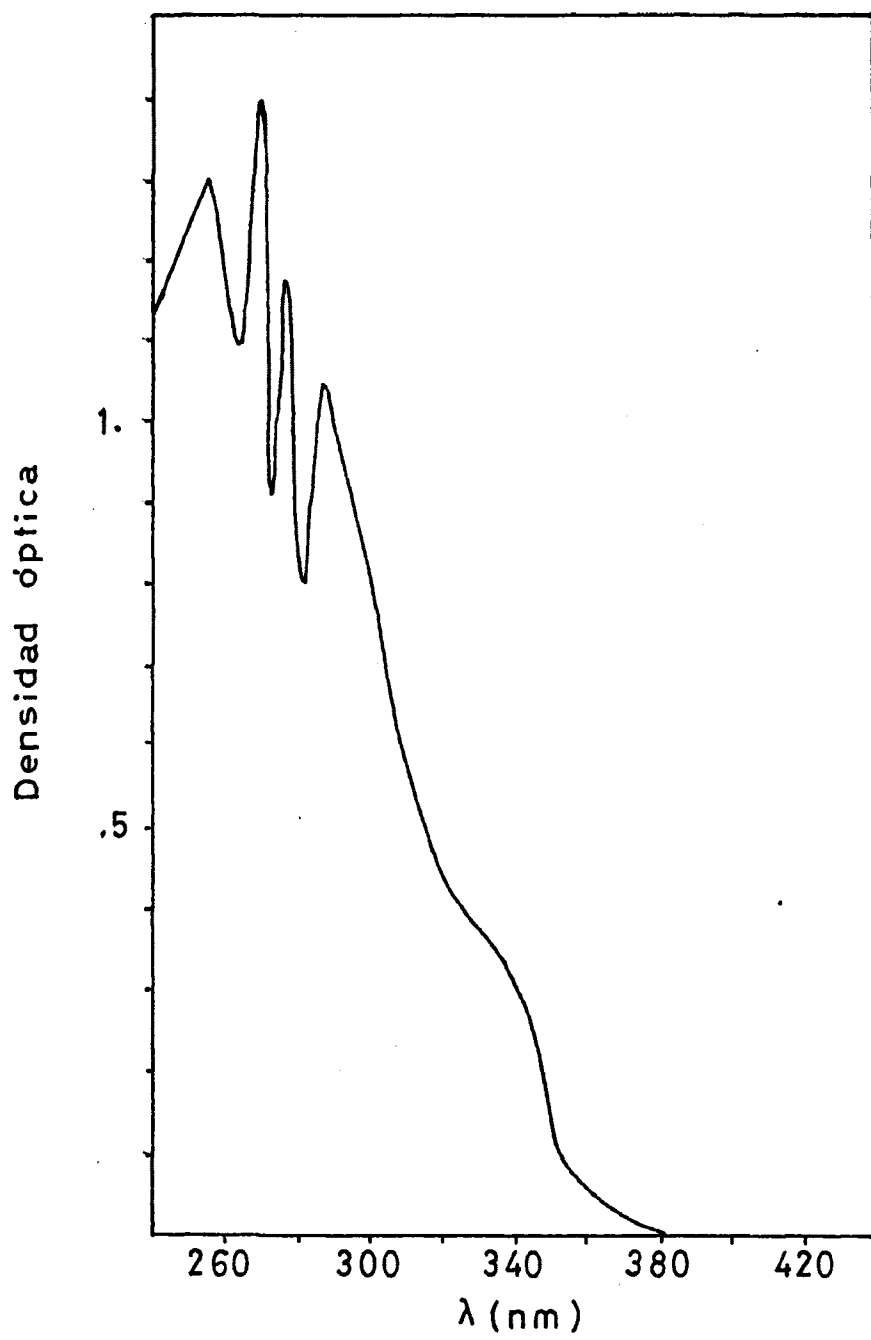


Figura 8 - Espectro de absorción de atranorina.

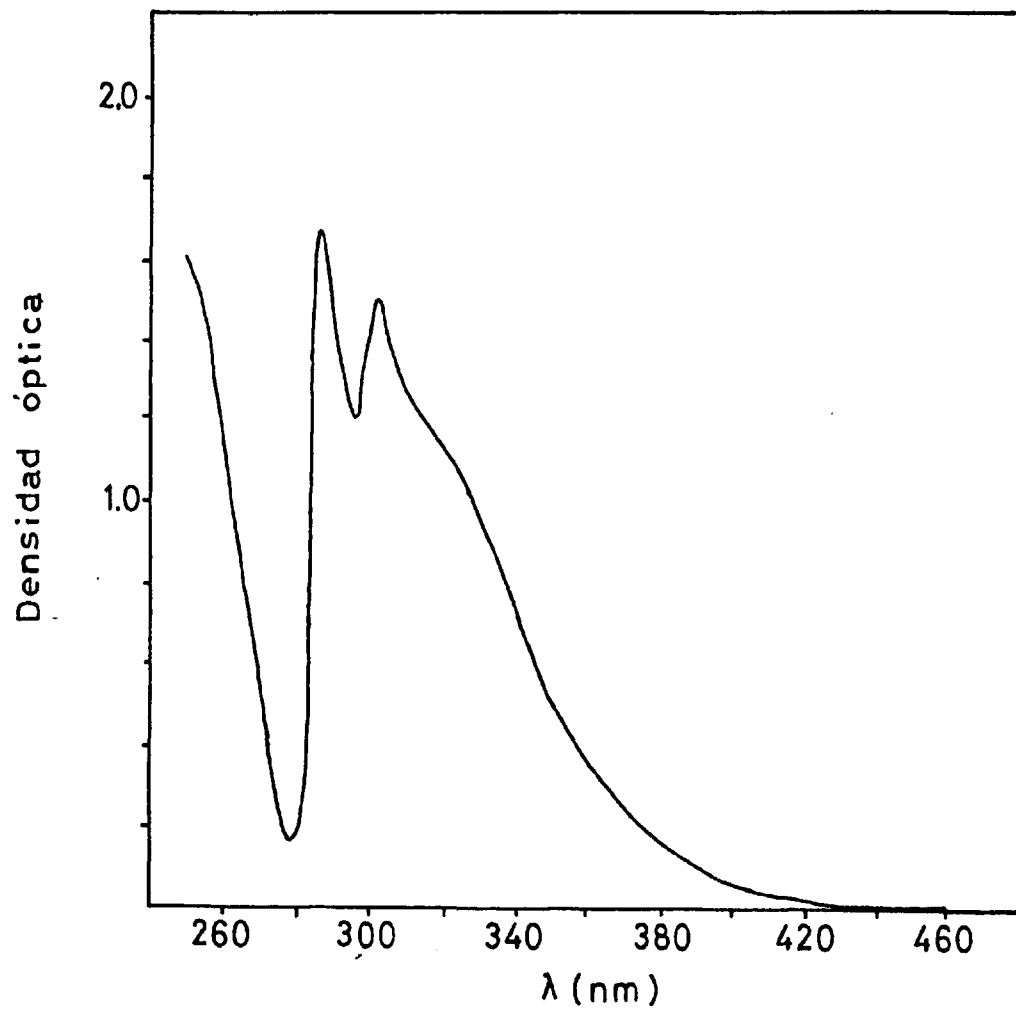




Figura 9 - Espectro de absorción de ácido fumarprotocetrárico.

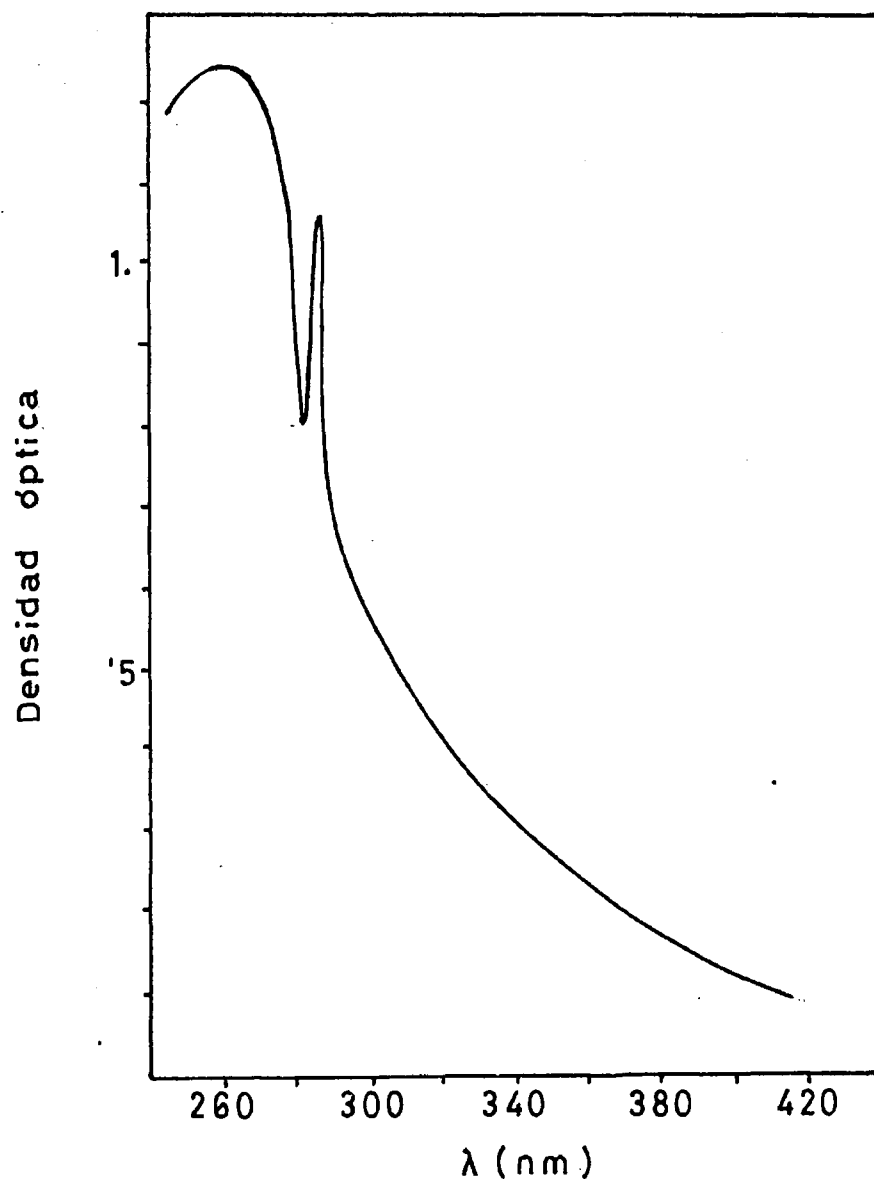


TABLA 4

DENSIDADES ÓPTICAS

(nm)	ACIDO LECANÓRICO		ACIDO CAPERÁTICO		ATRANORINA	
	0,33 mg/ml	3,3 mg/ml	0,33 mg/ml	3,3 mg/ml	0,33 mg/ml	3,3 mg/ml
256	0,104	1,05	0,129	1,297	0,125	1,26
274	0,094	0,941	0,111	1,113	0,114	1,147
286	0,091	0,916	0,104	1,052	0,104	1,046

Los coeficientes de extinción para las tres sustancias de las tres longitudes de onda se calculan mediante la fórmula $E = DO/C \cdot l$ siendo C la concentración de la sustancia y l el diámetro de la cubeta del espectrofotómetro, que en cualquier caso equivale a 1 cm. La relación entre las variables DO , E y C se plantean mediante un sistema de tres ecuaciones Xavier Filho & Vicente (78).

La validez global era de 69 mg de sustancias liquénicas por gramo de talo. En la tabla 5 damos los resultados gravimétricos y espectrofotométricos.

El ácido fumarprotocetrárico se valoró por colorimetría mediante la reacción con p-fenilendiamina, midiendo el color desarrollado a 450 nm. Las densidades ópticas se transformaron en concentraciones utilizando una recta patrón (Figura 10) construida con ácido fumarprotocetrárico purificado por cromatografía.

2. 5. - Preparación del extracto libre de células.

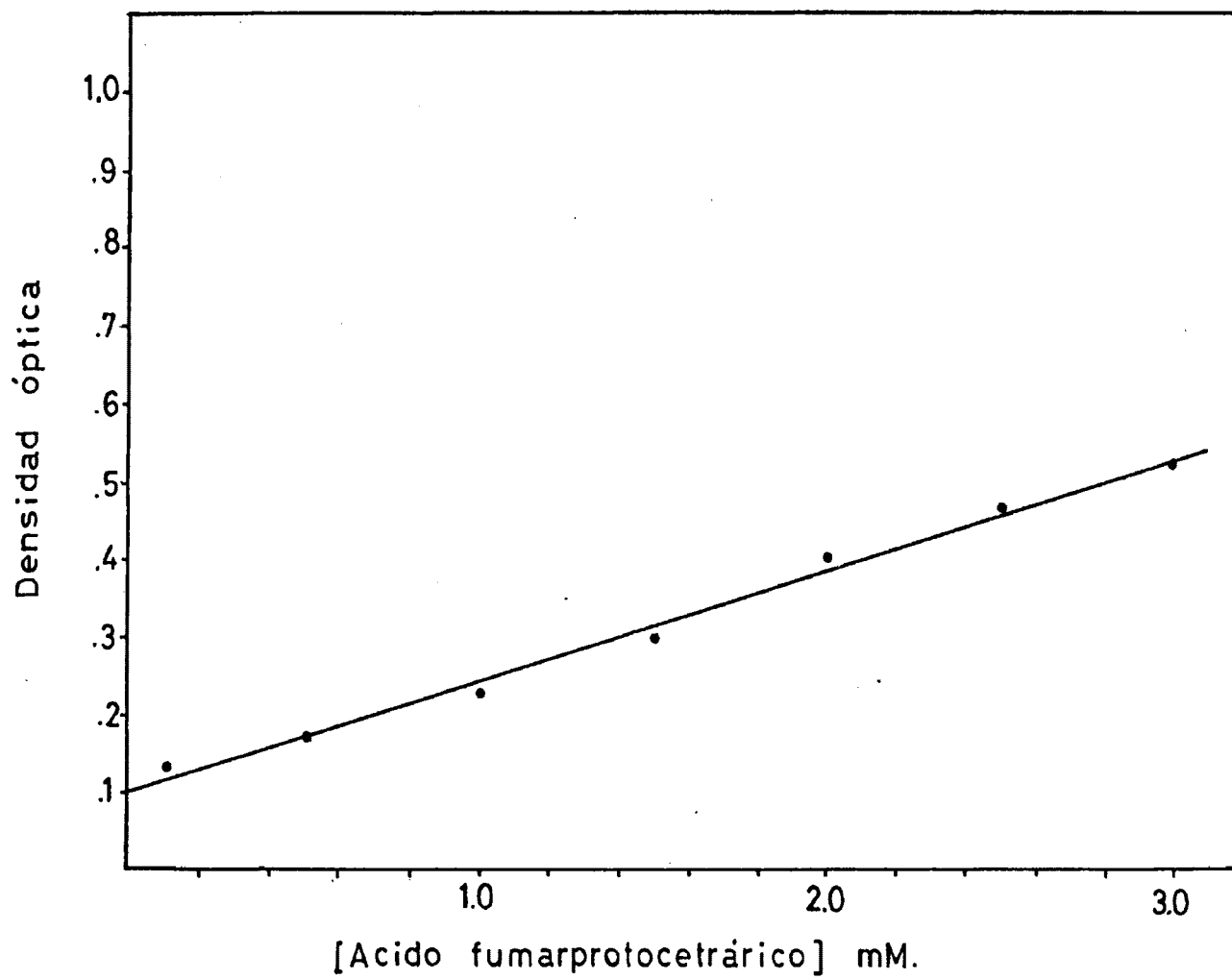
Los talos de Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris, después de lavados en agua destilada, se maceraron en un mortero con arena de cuarzo, suspendiendo el macerado en 10 ml del tampón fosfato 75 mM, pH 6,9. La suspensión se

TABLA 5

MÉTODOS DE MEDIDAS

ÁCIDOS LIQUÉNICOS (mg)	GRAVIMÉTRICAS	ESPECTROFOTOMÉTRICAS
LECANÓRICO	46,91	45,67
CAPERÁTICO	20,65	21,45
ATRANORINA	0,99	1,02
TOTAL	68,55	68,14

Figura 10 - Recta patrón para valoración del ácido fumarpro-
tocetrárico.



centrifugó a 27.000 xg durante 20 minutos a 4° C, en una centrifuga Lourdes, modelo AA-C, AC, pasando a continuación el sobrenadante por un filtro Millipore GS de 0,22µ de poro para conseguir el extracto libre de células.

2. 6. - Valoración de proteínas.

Las proteínas fueron valoradas por los métodos de Lowry et.al. y por el método de Warburg y Christian.

Valoramos las proteínas de los ficobiontes y micobiontes de Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris por el método de Lowry et. al.(79), basándose en la producción de color por el reactivo de fenoles. Como proteína patrón se utilizó seroalbumina bovina (Armour).

En el caso de valoración de proteína los extractos del talo utilizamos el método de Warburg & Christian (80). Las medidas de proteínas fueron obtenidas en un espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL.

2. 7. - Valoración de la actividad ureásica.

Para valorar la actividad ureásica de extractos enzimáticos provenientes de talos de Parmelia roystonea

y Cladonia verticillaris, fué medida la producción de amoníaco por el método de microdifusión de Conway (81).

La valoración del sulfato amónico fué realizada por el método de Nessler (82).

2. 8. - Purificación de ureasa.

En el caso de Parmelia roystonea, no fué posible hacer la purificación del enzima, teniendo en cuenta la poca cantidad existente del material.

Al poseer más cantidad de material liquénico de Cladonia verticillaris, decidimos purificar el enzima de esta especie.

La purificación del enzima se llevó a cabo a partir de 50 g de talo liquénico incubado y macerado con 200 ml de tampón fosfato 1mM pH 6,9 y centrifugado a 17.000 xg durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se lleva a un 60% de saturación con sulfato amónico, conservándolo en reposo durante una hora a 4° C y es centrifugado más tarde a 29.000 xg durante 30 minutos. El precipitado se disuelve en 60 ml del mismo tampón y se adsorbe en gel de fosfato cálcico estabilizado con tampón fosfato 1 mM pH 6,9. La proteína es eluida al aumen

tar la molaridad del tampón. La fracción eluida con tampón 20 mM, es filtrada a través de Sephadex G-200 en una columna de 21 cm de altura por 3 cm de diámetro; esta columna es equilibrada con el mismo tampón de la elución previa; se filtran las proteínas aumentando los volúmenes de dicho tampón que pasa a través de la columna.

La localización del enzima se ha intentado, separando el ficobionte del micobionte a través de la destrucción mecánica del talo entre dos láminas, y aplicándose en ellos el método de valoración anteriormente descrito.

3. RESULTADOS.

3. 1. - Parmelia roystonea

3. 1. 1. - Determinación de la nueva especie:

La existencia del género Parmelia en los trópicos es muy abundante, llegando aproximadamente a trecientas especies distintas (83), (84). Parmelia fué dividida por Hale y Kurokawa (85) en secciones y subsecciones para facilitar el estudio sistemático, morfológico y químico. El propio Hale (86), en los últimos años, creó cuatro nuevos géneros entre la Sección Parmelia, incluyéndolas en la familia Parmeliaceas, realizando en seguida las monografías de los nuevos géneros; Bulbothrix (Hale, 1976) (87); Parmelina (Hale, 1976), (88); Relicina (Hale, 1976), (89); Pseudoparmelia (Hale, 1976), (90). Para un mejor esclarecimiento de las modificaciones hechas por Hale (86), (91) para crear los nuevos géneros se describe la presencia o ausencia de parénquimas, platenquinas y o pseudopletenquina en los talos liquénicos observados en el microscopio electrónico y el microscopio de barrido.

Es posible que las Parmelias del grupo borreri, pertenecientes a la Sección Simples, al que pertenece la especie que estamos estudiando ahora, sean inclui-

das, muy pronto, en otro género por Hale. Hasta la fecha, no tenemos conocimiento de ninguna modificación acerca de dicho grupo.

La especie que estamos estudiando pertenecía a la Sección Parmelia, creada por Imshaug en 1957, (92). A su vez Hale & Kurokawa incluyeron en dicha Sección una nueva Subsección llamada Simples, (85). Basándose también en características morfológicas y químicas, quedó ésta con 20 especies, morfo-químicamente bien dividida, de las cuales 4 especies poseen ácido girofórico, 8 especies poseen ácido lecanórico y las especies restantes poseen indistintamente ácidos protolicestérico, caperático, úsnico y ácido grasos.

En el caso particular de atranorina, 15 especies la poseen, mientras que las 5 restantes no la poseen, (Tabla 6).

Después de incansables estudios morfológicos y quimiotaxonómicos, llegamos a la conclusión, de que se trata de una nueva especie, (Tablas 6 y 7).

ACIDOS LIQUÉNICOS PARMELIAS DEL GRUPO BORRERI	ÁCIDO O-ORCÉLICO	ÁCIDO GRASOS	ATRANORINA	A.PROTOLIQUESTÉRICO	ÁCIDO ÚSNICO	ÁCIDO CAPERÁTICO	ÁCIDO LECANÓRICO	ÁCIDO GIRFÓRICO
P.APPALACHENSIS W. CULB.			X	X				
P.BOLLIANA MULL. ARG.			X	X				
P.BORRERI (SM.) TURN.	X		X					
P.BORRERINA NYL.			X					X
P.CANALICULATA LYNGE			X			X		
P.DICTYOIDES HUE			X	X		X		
P.FLAVENTIOR STIRT.					X		X	
P.HYPOLEUCITES NYL.			X				X	
P.INCORRUPTA MONRE							X	
P.LORENTZU KREMPELH.			X				X	
P.MICROSTICTA MULL. ARG.			X	X				
P.NEGATA NYL.		X						
P.NEUTRALIS HALE		X	X					
P.POLYCARPINA ZAHLBR.			X				X	
P.REDDENTA STIRT.			X					
P.RUDECTA ACH.		X	X				X	
P.SUBFLAVA TAYL.							X	
P.SUBRUDECTA NYL.			X				X	
P.SUBPRAESIGNIS NYL.			X					X
P.STICTICA (DUBY) NYL.								X

TABLA 7

CARACTERES MORFOLÓGICOS DE PARMELIAS DEL GRUPO BORRERI	ISIDIA CILÍNDRICA	ISIDIA LOBULADA	PUSTULA	SOREDIO LAMINAR	PSEUDOCIFELADO	APOTECIO
P.APPALACHENSIS W. CUBB.		X			X	X
P.BOLLIANA MULL. ARG.		X			X	X
P.BORRERI (Sm.) TURN.				X	X	X
P.BORRERINA NYL.					X	X
P.CANALICULATA LYNGE					X	X
P.DICTYOIDES HUE					X	X
P.FLAVENTIOR STIRT.				X	X	X
P.HYPOLEUCITES NYL.					X	
P.INCORRUPTA MONRE					X	X
P.LORENTZU KREMPELH.					X	X
P.MICROSTICTA MULL. ARG.					X	X
P.NEGATA NYL.					X	
P.NEUTRALIS HALE				X	X	
P.POLYCARPINA ZAHLBR.					X	X
P.REDDENTA STIRT.				X	X	
P.RUDECTA ACH.	X	X			X	
P.SUBFLAVA TAYL.		X			X	X
P.SUBRUDECTA NYL.				X	X	
P.SUBPRAESIGNIS NYL.		X			X	X
P.STICTICA (DUBY) NYL.				X	X	

3. 1. 2. - Parmelia roystonea Vicente & Xavier
Filho sp. nov. (Figura 11).

Talo superficial, pseudocifelado de 3 a 6 cm de diámetro, pseudocifelas suborbiculares, ovales; soredios en toda la extensión del talo; Apotecios raros, muy pequeños de 1 a 1,5 mm de diámetro, rizinas simples negras.

Reacciones: talo K⁺ amarillo, médula K⁻, C⁺ rojo, KC⁺ rojo, P - negativo.

Química: ácido lecanórico, ácido caperático y a tranorina presentes (Figuras 12, 13 y 14).

Distribución: Particularmente en el nordeste brasileño, en plazas y parques de la ciudad de Recife-Pernambuco.

Material depositado en el Herbario de Criptógamas del Departamento de Biología Especial - Centro de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Pernambuco, con el número 1.311.

Discusión: La nueva especie descrita en la memoria, es considerada una quimioespecie de acuerdo con la opinión de Hawksworth (93); el hecho de diferenciarse básicamente de Parmelia subrudecta, se basa en la pre

Figura 11 - Talo de Parmelia roystonea sp. n. en mm.

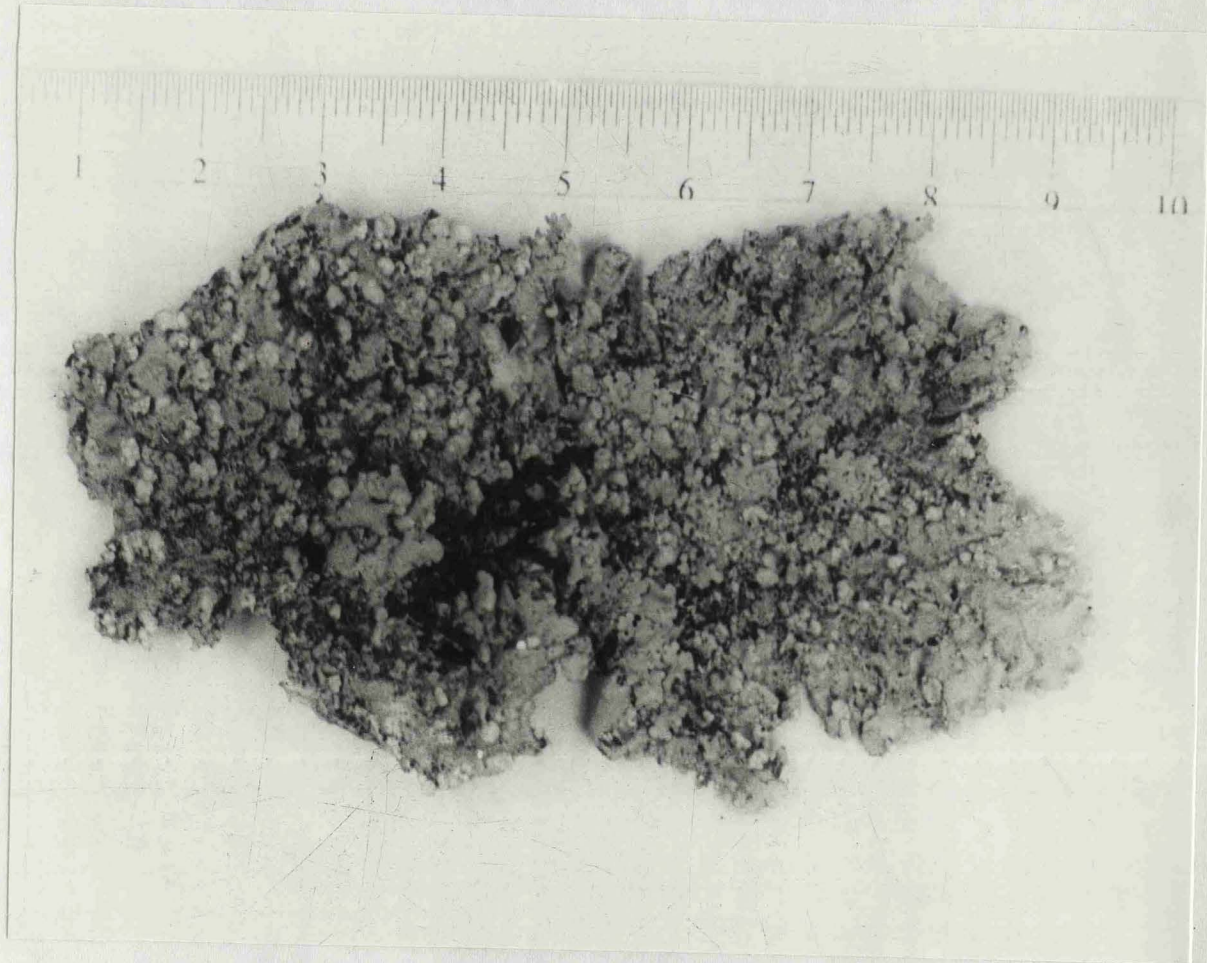


Figura 12 - Microcristalización de ácido lecanórico con GE,
aislado de Parmelia roystonea: a, en lavado ace
tónico y b, en cromatografía con celulosa.

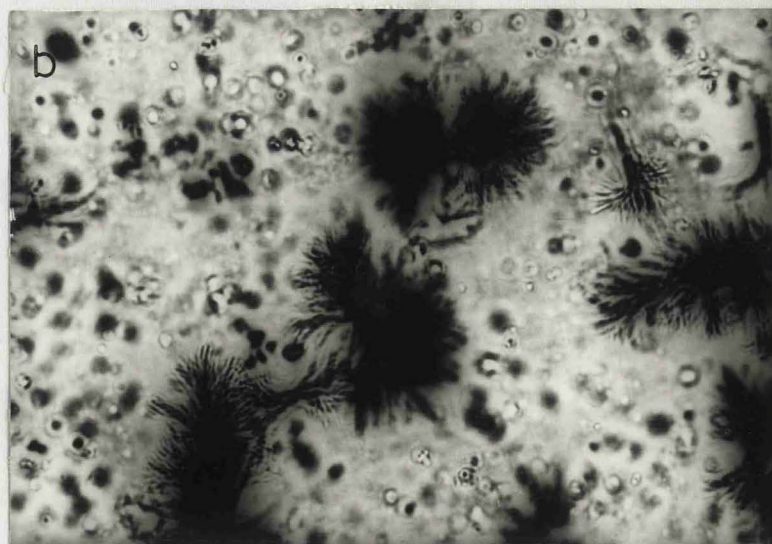


Figura 13 - Microcristalización de ácido caperático con GE,
aislado de Parmelia roystonea: a, en lavado ace
tónico y b, en cromatografía con celulosa.

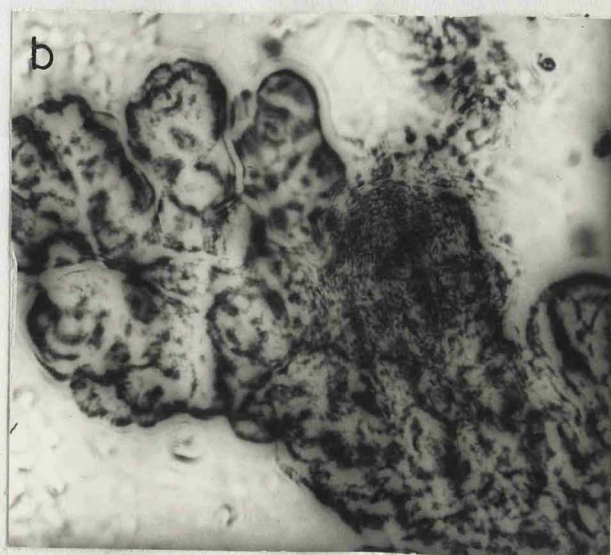
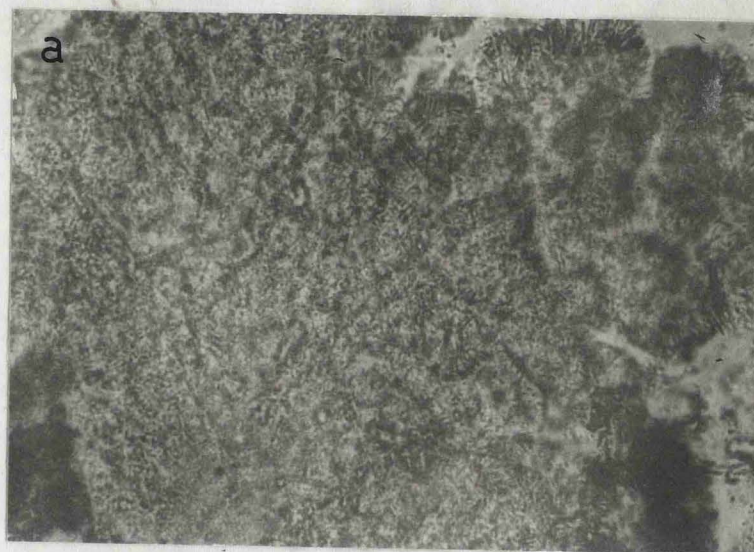
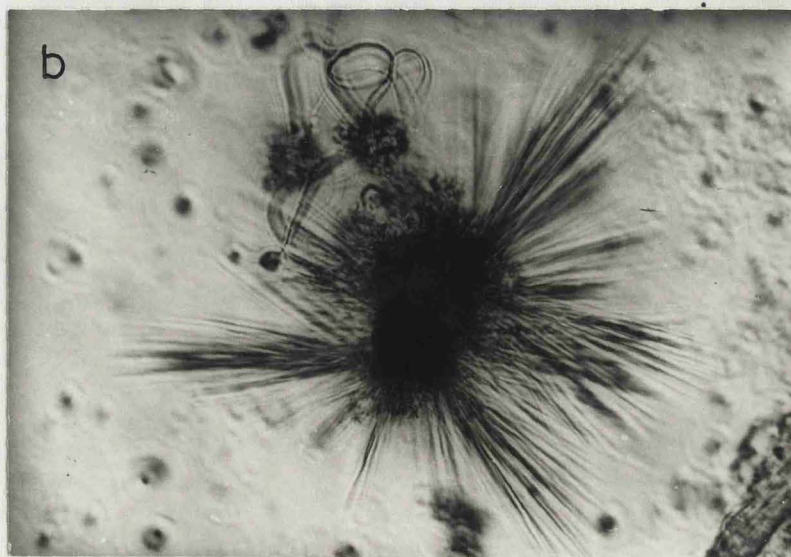
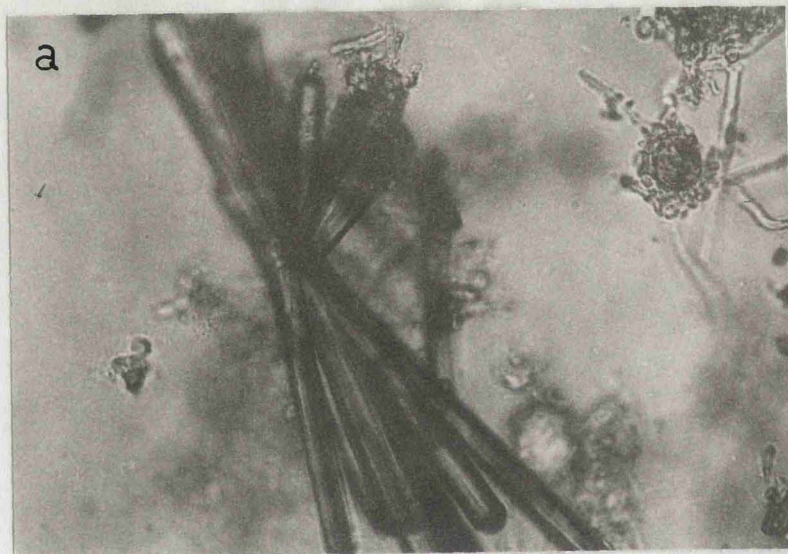


Figura 14 - Microcristalización de atranorina con o-t aislado de Parmelia roystonea: a, en lavado acetónico y b, en cromatografía con celulosa.



sencia del ácido caperático y en la diferencia morfológica del soledio y su disposición en el talo (Figura 15 y 16), vista en microscopio de barrido. Damos para una mejor demostración las tablas 7 y 8 con las distinciones morfológicas y sinonimias de todas las especies hasta ahora descritas.

3. 1. 3. - Diagnosis Latina.

Thallus superne pseudocyphellatus ad 3-8 cm latus, pseudocyphellis suborbicularibus ovatis, soledis in lato thallo; rhizinis nigris, simplicibus, apotheciis minimis rarisque ad 1-1.5 cm diametro. Acidus lecanoricus, caperaticus et atranorina praesentes.

Figura 15 - Soredio de Parmelia roystonea visto en el microscopio de barrido a, soredio (X3,500); b, soredio y porción de pseudocyfela (X650).

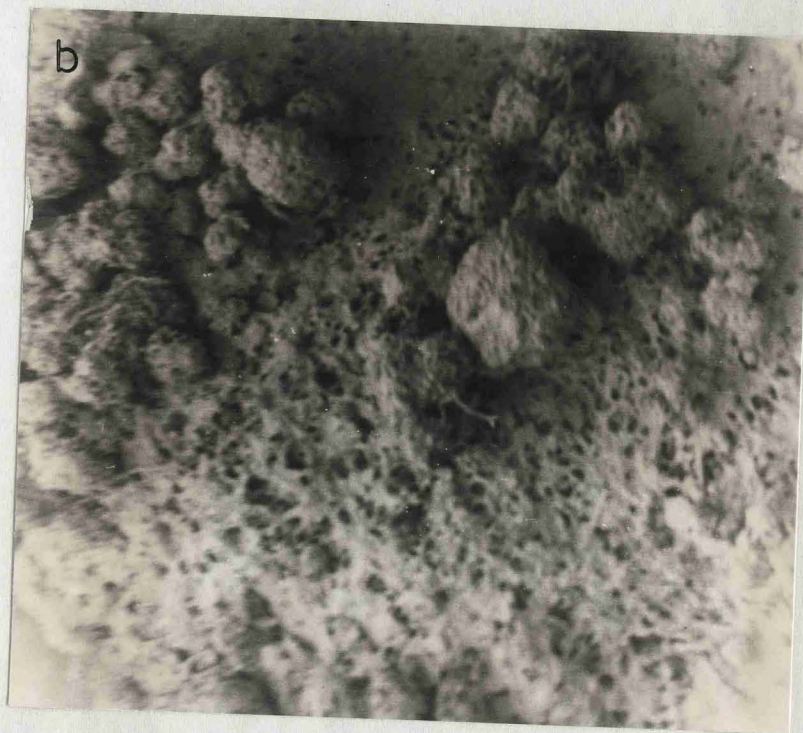
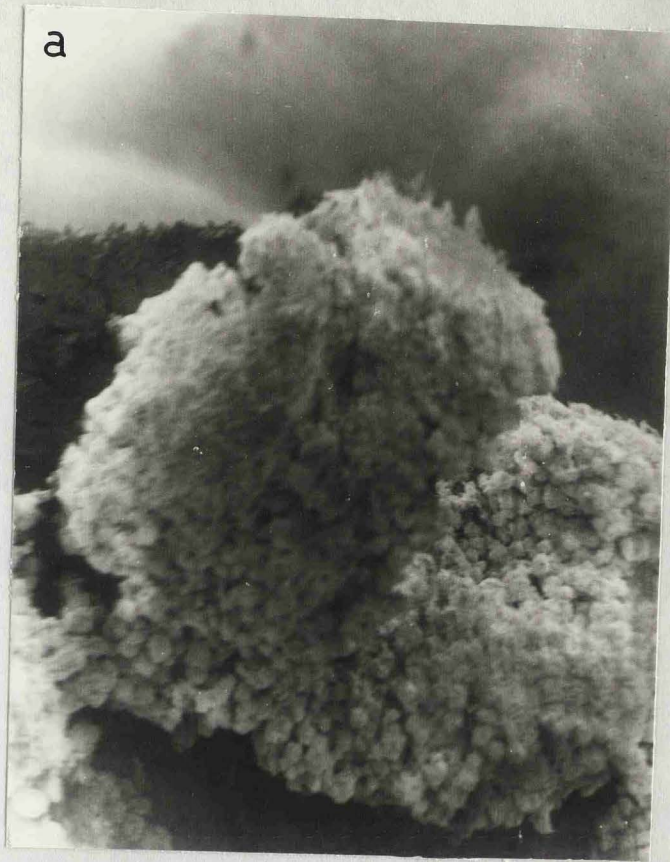


Figura 16 - Soredios de Parmelia roystonea visto en el microscopio de barrido: a, otra visión del soredio (X3.500); b, conglomerado de soredios (X2.000).

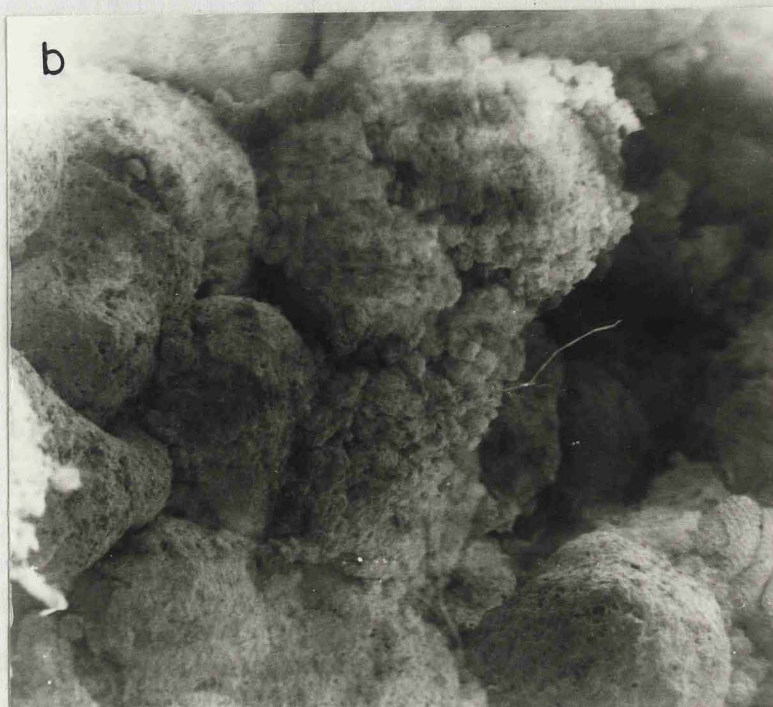
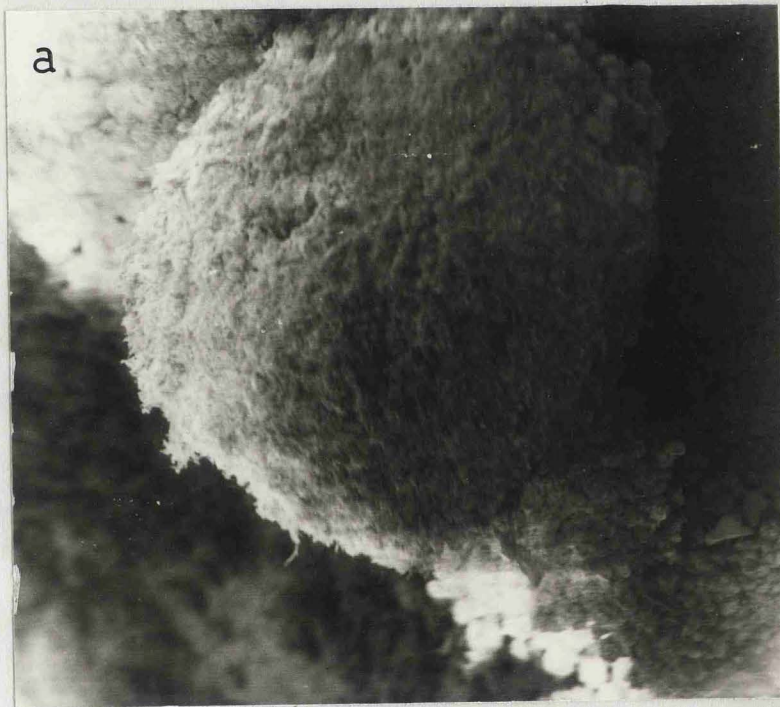


TABLA 8

SINONIMIA DE ALGUNAS PARMELIAS DEL GRUPO BORRERI

PARMELIAS DEL GRUPO BORRERI	SINONIMIAS
P. BOLLIANA MULL. ARG.	P. FRONDIFERA MERR.
P. BORRERI (Sm.) TURN.	P. PSEUDOBORRERI ASAHINA
P. FLAVENTIOR STIRT.	P. SOREDICA NYL. P. KERMNSTOCKII (LYNGE) ZAHLBR. P. HIMALAYENSIS NYL. P. ANDREANA MULL. ARG.
P. RUDECTA ACH.	P. RUDERATA ASAHINA P. RUDERATA VAR. MICROPHYLLINA
P. SUBRUDECTA NYL.	P. DUBIA (WULF.) SCHAEER. P. ULOPHYLLA (ACH.) MERR.

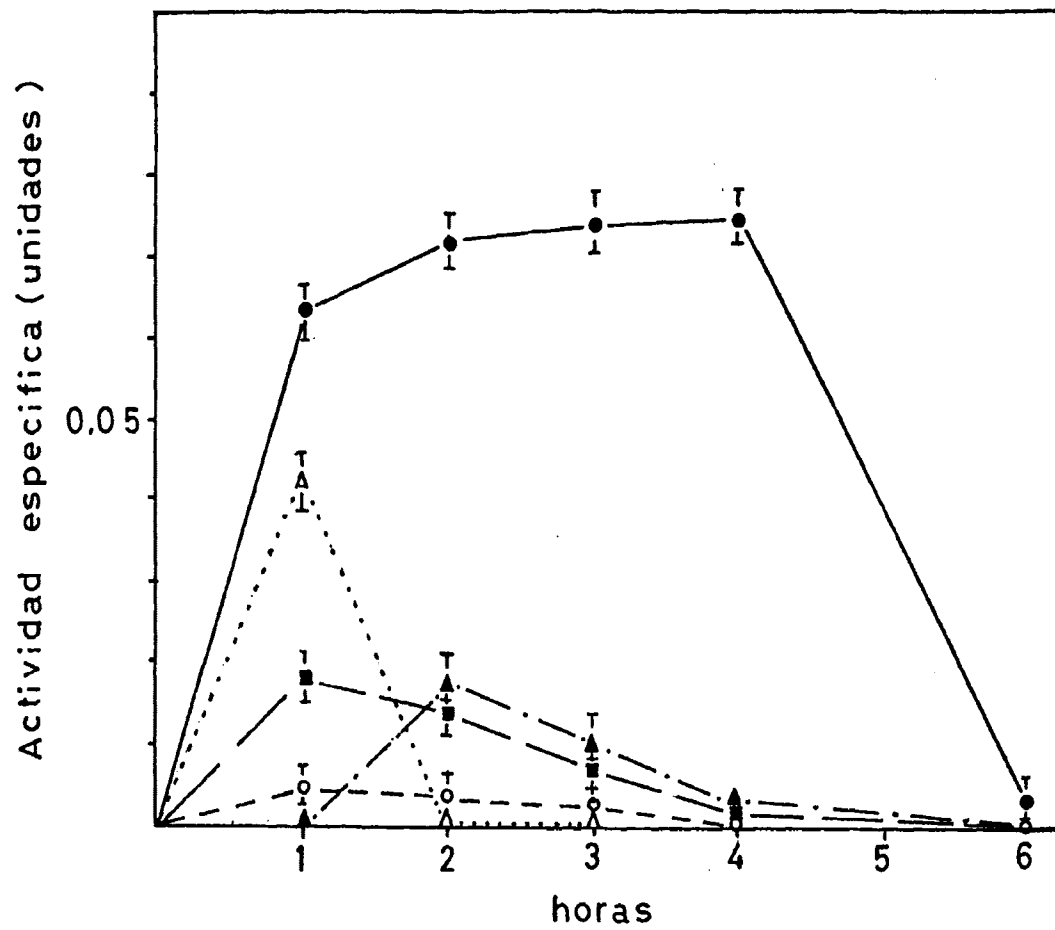
3. 1. 4. - Síntesis de ureasa.

Parmelia roystonea sin ningún tratamiento previo no muestra actividad ureásica detectable. Cuando discos de talo se mantienen flotando sobre urea 40 mM a 37° en oscuridad, se desarrolla actividad ureásica que aumenta progresivamente hasta hacerse máxima a la cuarta hora de incubación para descender después. Una serie paralela, mantenida bajo condiciones de iluminación, según se describe en métodos, muestra una leve aparición de actividad enzimática que se anula prácticamente en la segunda hora de incubación. La inclusión de antimetabolitos en el medio de cultivo en oscuridad (actinomicina D. 50 µM, cicloheximida 10 µg/ml y cloranfenicol 200µg/ml) modifican en gran manera la conducta descrita. En los tres casos, solo es detectable actividad enzimática en la primera hora de cultivo, actividad que desaparece completamente con posterioridad. La inclusión de los mismos antimetabolitos en los medios de incubación, en condiciones de iluminación, no permiten la aparición de actividad ureásica detectable (Figura 17).

Los medios en los que fueron incubados los discos de talo, tanto a la luz como en oscuridad, en au-

Figura 17 - Síntesis de ureasa en talo de Parmelia roystonea;

(●) oscuridad; (○) luz; (▲) oscuridad y adición de actinomicina D; (△) oscuridad y adición de cicloheximida; (■) oscuridad y adición de cloranfenicol.



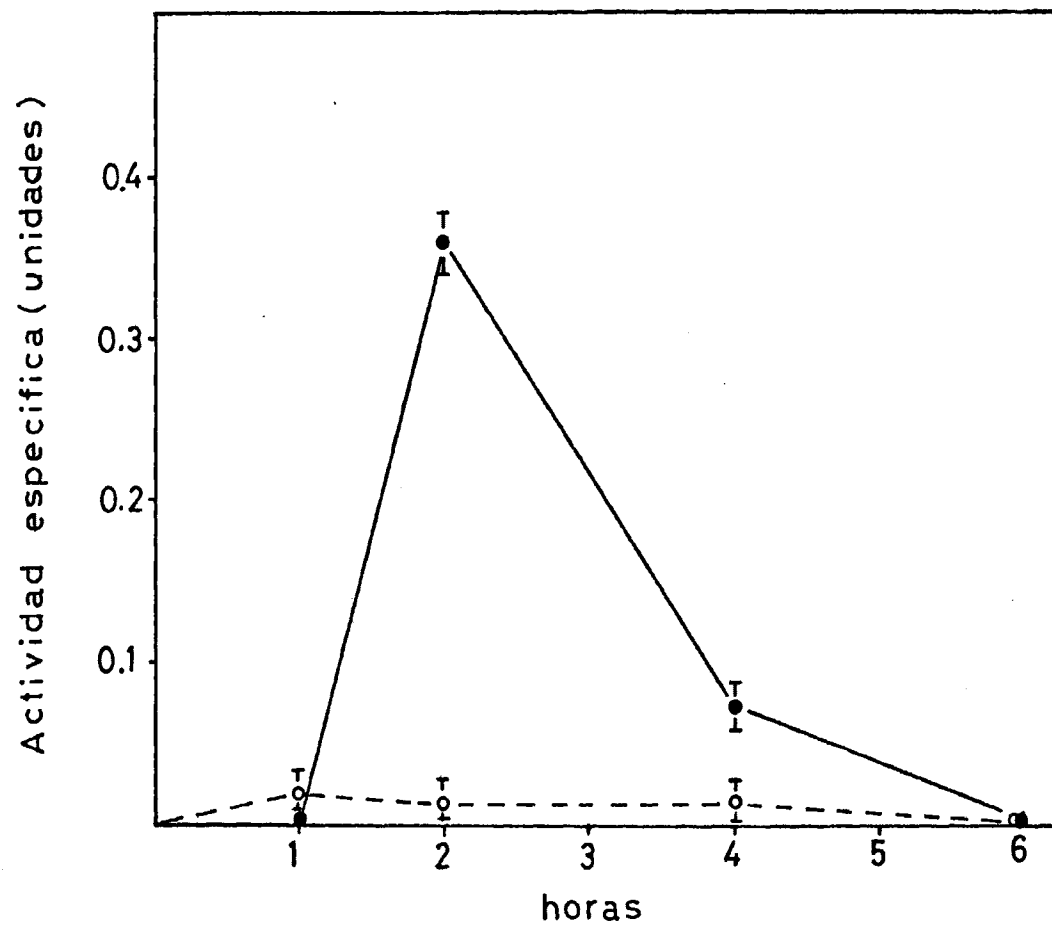
sencia de antimetabolitos, fueron dializados frente a tampón fosfato, 75 mM, pH 6,9, durante 24 horas a 4° C, con objeto de eliminar de ellos tanto la urea, como las formas de bajo peso molecular que el líquen hubiera podido excretar.

La medida de ureasa en estos medios dializados demuestra que el enzima es excretable. Para discos de talo incubados en obscuridad se observa una excreción de ureasa al medio que muestra su máximo valor para la segunda hora de incubación, disminuyendo posteriormente hasta anularse a partir de la quinta hora. En condiciones de iluminación, la excreción de ureasa al medio es cuantitativamente menor, detectándose particularmente en la primera hora de cultivo para anularse después (Figura 18).

3. 1. 5. - Evolución de sustancias líquénicas.

El contenido en ácido lecanórico en el talo de Parmelia roystonea, mantenido en obscuridad, aumenta durante las dos primeras horas de cultivo, para luego disminuir, por ser en parte excretado al medio, como se observa en la tabla 9; comienza a aparecer ácido lecanórico en el medio a partir de las dos primeras horas, aumentando progresivamente hasta las seis horas de cultivo en obsucuridad.

Figura 18 - Excreción de ureasa a los medios de incubación
por Parmelia roystonea, (●) oscuridad y (○) luz.



En el talo mantenido en luz parece disminuir el ácido lecanórico en el talo para anularse a las cuatro horas de incubación, siendo para este mismo tiempo muy pequeña la cantidad de la sustancia excretada al medio.

El comportamiento de la atranorina es semejante al del ácido lecanórico, aumentando su concentración durante las cuatro primeras horas de incubación en obscuridad para las cuales hay también excreción al medio y anulándose en el talo a las seis horas de incubación, para las cuales disminuye también mucho su concentración en el medio. En el talo incubado en luz también hay menor síntesis de atranorina en obscuridad, anulándose para la sexta hora de incubación, para la cual aparece una pequeña cantidad de atranorina en el medio (Tabla 9).

El comportamiento del ácido caperático es totalmente distinto, aumentando su concentración tanto en el talo como en el medio, conforme aumenta el período de incubación en obscuridad. En luz aumenta solo hasta las dos horas de incubación, para las cuales hay excreción al medio. A partir de las cuatro primeras horas disminuye considerablemente su concentración en el talo, siendo nula la excreción a las seis horas (Tabla 9).

TABLA 9

TRATAMIENTO	HORAS	ACIDOS LIQUÉNICOS (mg/g talo)					
		LECANÓRICO		CAPERÁTICO		ATRANORINA	
		EN EL TALO	EXCRETADO	EN EL TALO	EXCRETADO	EN EL TALO	EXCRETADO
OSCURIDAD	0	45,67 ± 4,8	0, 0	21,45 ± 1,9	0, 0	1,02 ± 0,1	0,0
	1	63,60 ± 5,3	0, 0	58,93 ± 5,4	0,0	0,0	0,0
	2	83,40 ± 5,7	14,1 ± 1,3	52,25 ± 5,3	2,37 ± 0,2	4,95 ± 0,3	4,05 ± 0,1
	4	30,15 ± 2,8	30,0 ± 2,5	52,54 ± 5,3	2,22 ± 0,2	25,3 ± 2,5	20,0 ± 1,1
	6	10,5 ± 1,2	52,5 ± 3,9	214,85 ± 12,6	24,25 ± 1,9	0,0	3,45 ± 0,1
LUZ	0	45,67 ± 4,8	0, 0	21,45 ± 1,9	0,0	1,02 ± 0,1	0,0
	1	23,73 ± 2,1	0, 0	129,9 ± 9,3	0,0	15,9 ± 1,6	0,0
	2	10,55 ± 1,2	40,0 ± 3,7	161,85 ± 13,2	6,9 ± 0,4	31,95 ± 3,3	0,0
	4	0, 0	4,95 ± 0,4	78,37 ± 8,6	4,86 ± 0,2	16,54 ± 1,2	0,0
	6	0,0	0,0	36,6 ±	0,0	0,0	6,6 ± 0,1

3. 1. 6. - Efecto de sustancias liquénicas sobre actividad ureásica.

Casi todas las sustancias liquénicas tienen propiedades biológicas de estructuras típicas fenólicas, por ejemplo, su capacidad de inactivar enzimas.

Manso y Vicente en 1971, Vicente et al en 1973 y Vicente et al 1974, (63, 64 y 65) demostraron que el ácido L-úsnico inactiva la ureasa y glutamato deshidrogenasa de Proteus mirabilis. Se comprobó que la acción del ácido L-úsnico sobre la proteína puede ser un fenómeno de agregación molecular de oligómeros, teniendo en cuenta que la pérdida de actividad enzimática es paralela al aumento del peso molecular de la proteína.

Por lo ya demostrado, empleamos una nueva quimioespecie para la ciencia, que produce activamente ácidos lecanórico, caperático y atranorina.

Parmelia roystonea produce ureasa en condiciones similares a las de Evernia prunastri, teniendo en cuenta que en ambos casos las sustancias liquénicas se comportan como potentes inactivadores enzimáticos.

Utilizando sustancias liquénicas extraídas de talo de Parmelia roystonea, con ureasa cristalina comercial, ob-

tuvimos una pérdida de actividad enzimática a los 30 minutos de incubación; a los 60 minutos de incubación se llegó a una inactivación, y a los 90 minutos de incubación tuvo la pérdida total de actividad (Figura 19^b).

Utilizamos para pruebas cinéticas los ácidos lecanórico, caperático y atranorina purificados, dando como resultado los siguientes datos: Con ácido lecanórico, el enzima tuvo una pérdida total de actividad en 15 minutos de incubación (Figura 20); con ácido caperático, tuvo una pérdida total de actividad a los 60 minutos de incubación (Figura 21); con atranorina, tuvo una pérdida total de actividad a los 90 minutos de incubación (Figura 22).

Demostramos que la estructura furánica no es un elemento indispensable en el proceso de inactivación.

Con los datos anteriormente mencionados llegamos a la conclusión de que las sustancias liquénicas influyen decisivamente en la inactivación enzimática.

3. 1. 7. - Determinación de agregados.

Se valoró el efecto de las sustancias liquénicas purificadas a partir de Parmelia roystonea: atranorina, ácido lecanórico y ácido caperático. Para ello se filtró a través de

Figura 19 - Inactivación de ureasa por las sustancias líquénicas de Parmelia roystonea. 10 mg de ureasa cristalina se incuban a 37° C con 10 mg de sustancias líquénicas en un volumen final de 10 ml.

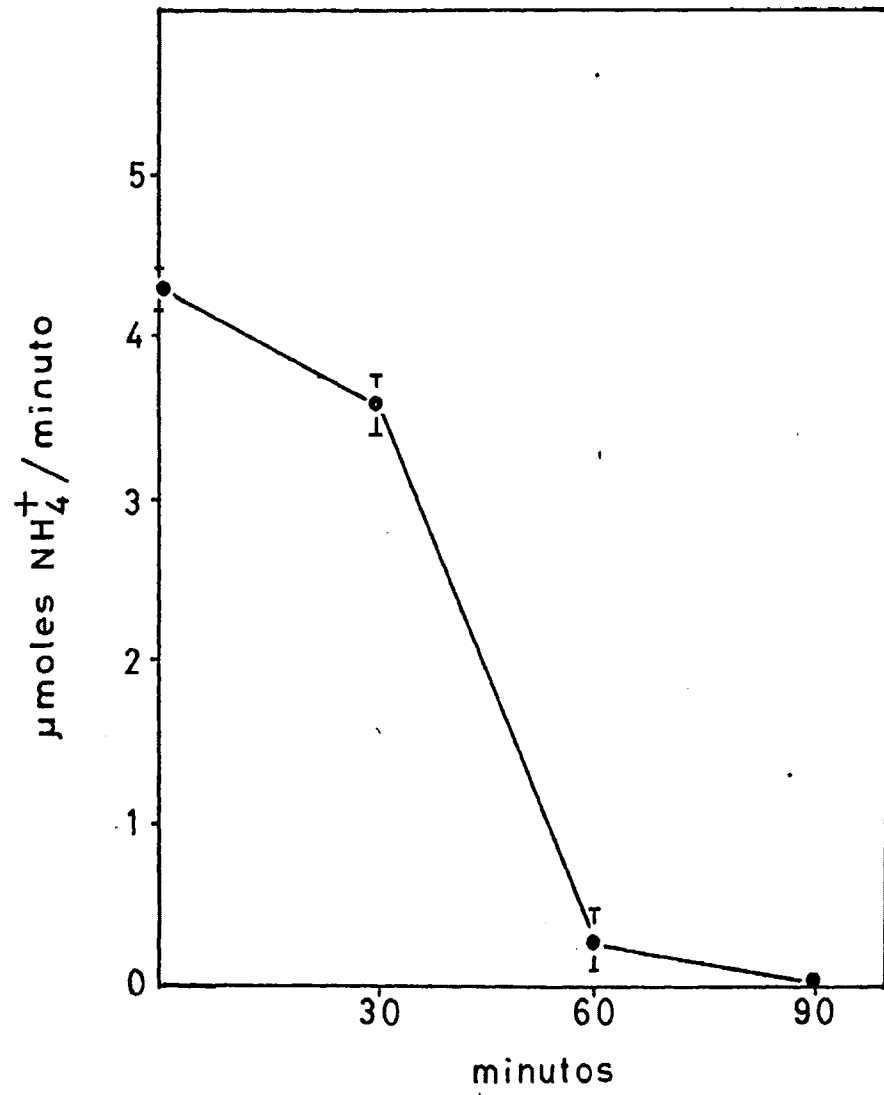


Figura 20 - Pérdida de actividad de una ureasa cristalina comercial en función del tiempo de tratatamiento por disoluciones salinas del ácido lecanórico.

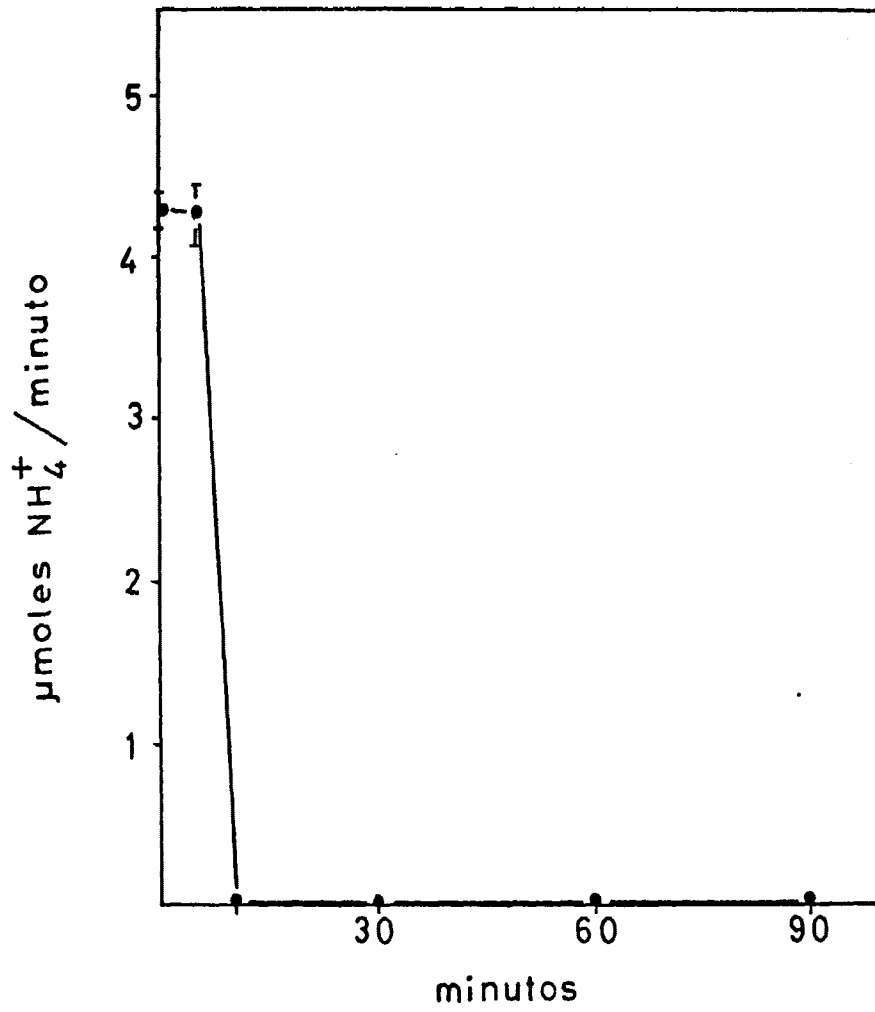


Figura 21 - Pérdida de actividad de una ureasa cristali
na comercial en función del tiempo de tratata
miento por disoluciones salinas del ácido
caperático.

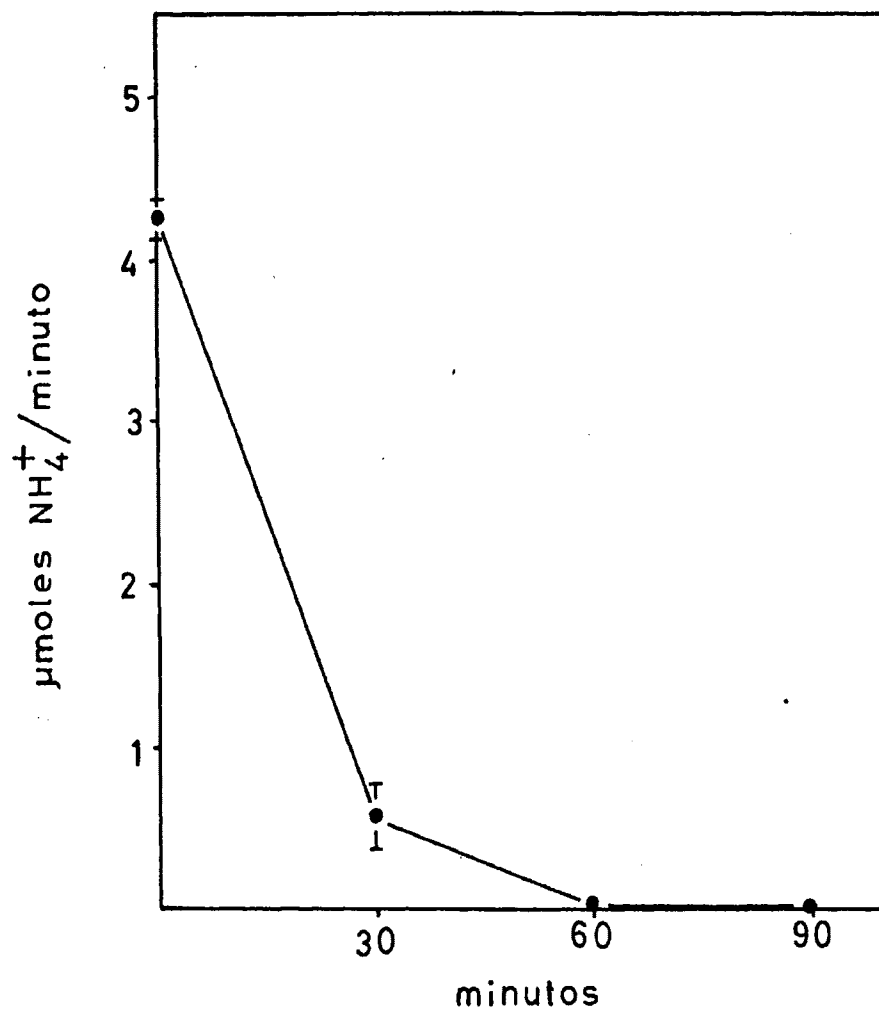
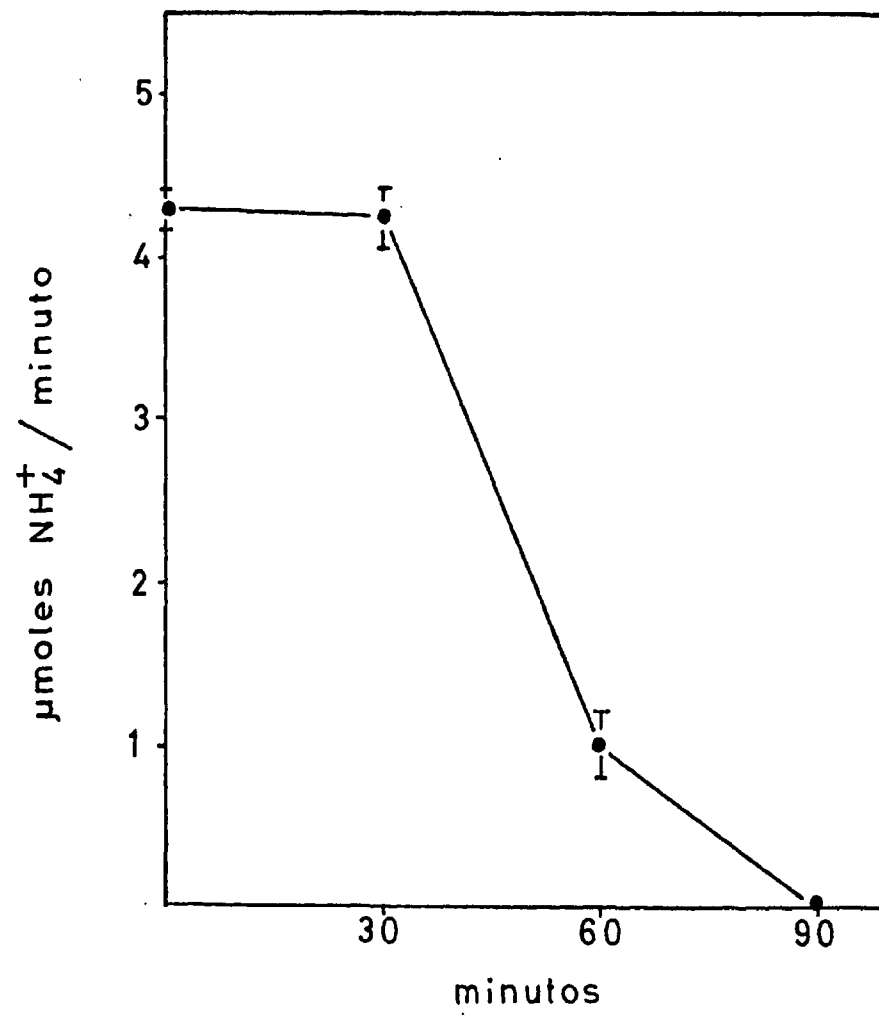


Figura 22 - Perdida de actividad de una ureasa cristalina comercial en función del tiempo de tra
tamiento con disoluciones salinas de atranor
ina.



Sepharosa 6B ureasa previamente incubada con cada una de las sustancias liquénicas, según se especifica en material y métodos.

En la figura 23 se observa que la ureasa nativa eluye a los 130 ml de filtrado. El tratamiento con atranorina y ácido lecanórico (Figura 24 y 25) provoca la agregación de ureasa formándose un polímero de alto peso molecular que eluye a los 10 ml de filtración y que no presenta actividad ureásica. También aparecen, como consecuencia de la incubación con estas sustancias liquénicas, formas oligoméricas de bajo peso molecular que eluyen después de los 210 ml de filtrado.

Sin embargo la incubación de ureasa con ácido caperático no provoca agregación, aunque causa inactivación del enzima (Figura 26). En la tabla 10 se da un resumen comparativo de estos datos.

3. 1. 8. - Localización del enzima.

Para determinar cual de los simbiontes era responsable de la actividad ureásica de Parmelia roystonea, se incubaron los ficobiontes y micobiontes previamente aislados, según se especifica en material y métodos, en urea 40 mM, valorándose a continuación la actividad ureásica en los dos simbiontes.

Figura 23 - Diagrama de elución a través de Sepharosa 6B de una muestra de ureasa cristalina; (●) proteína y (○) actividad específica.

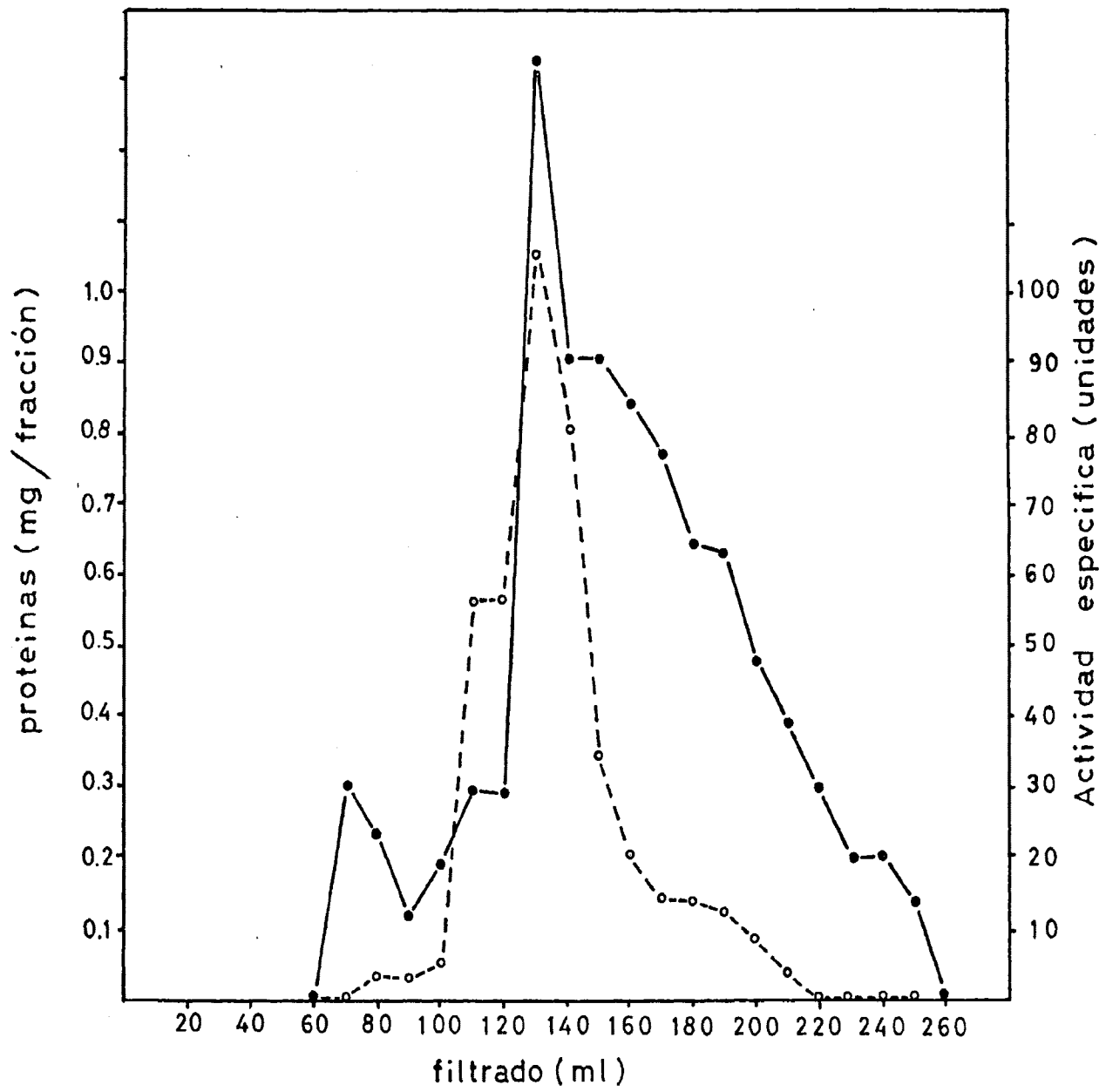


Figura 24 - Diagrama de elución a través de Sepharosa 6B de una muestra de ureasa cristalina incubada con ácido lecanórico; (●) proteína y (○) actividad específica.

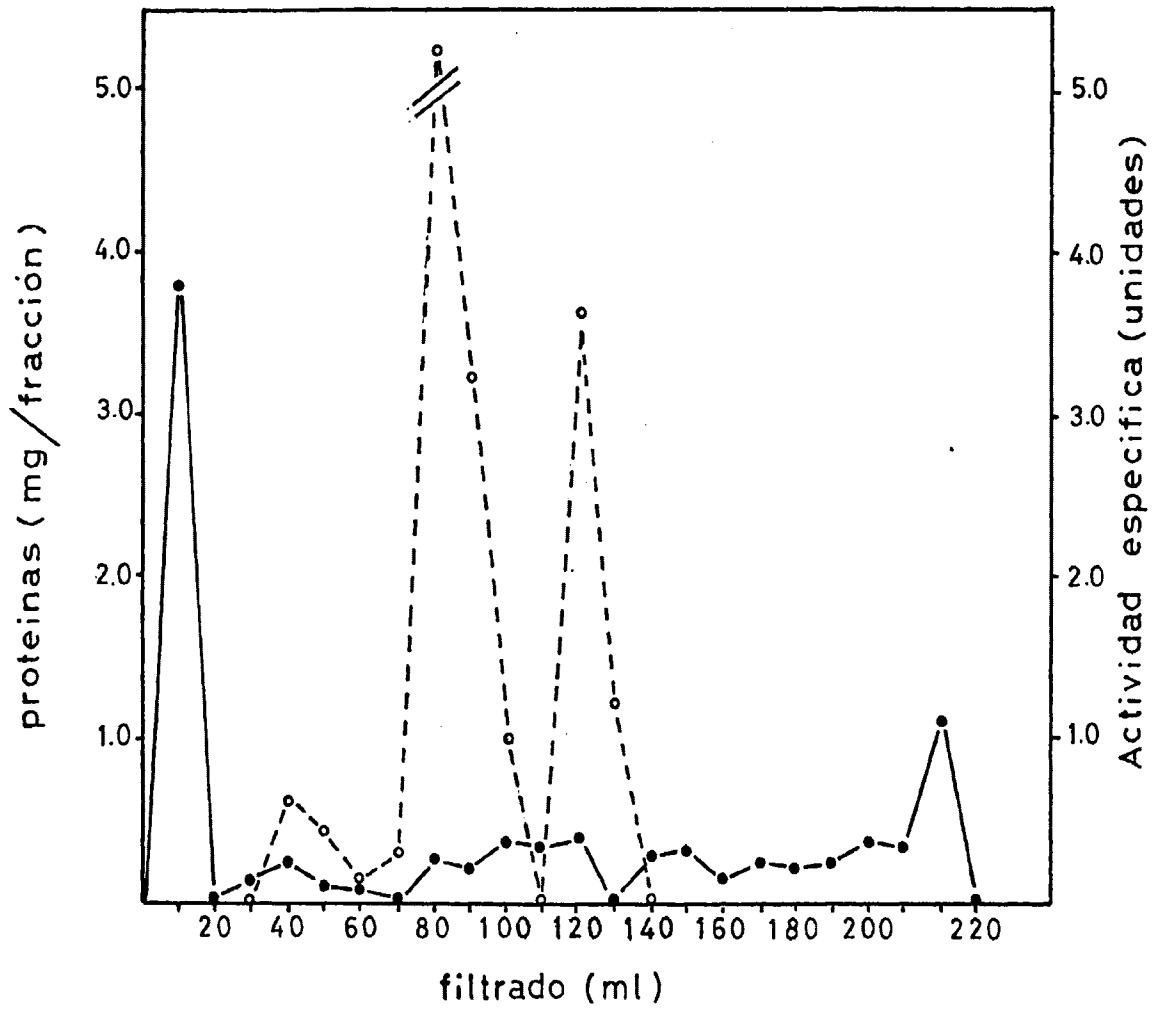


Figura 25 - Diagrama de elución a través de Sepharosa 6B de una muestra de ureasa cristalina incubada con a tranorina; (●) proteína y (○) actividad específica.

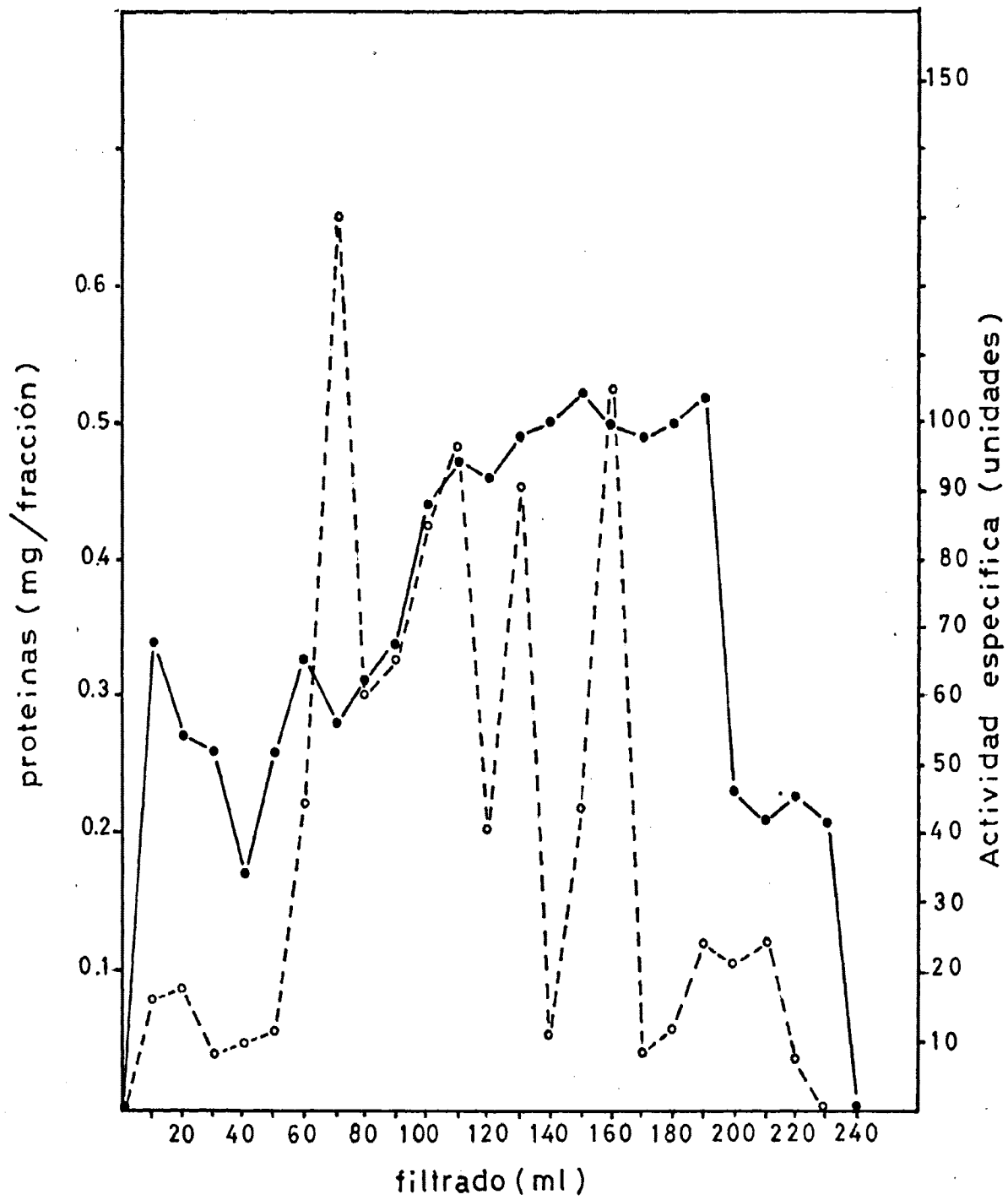
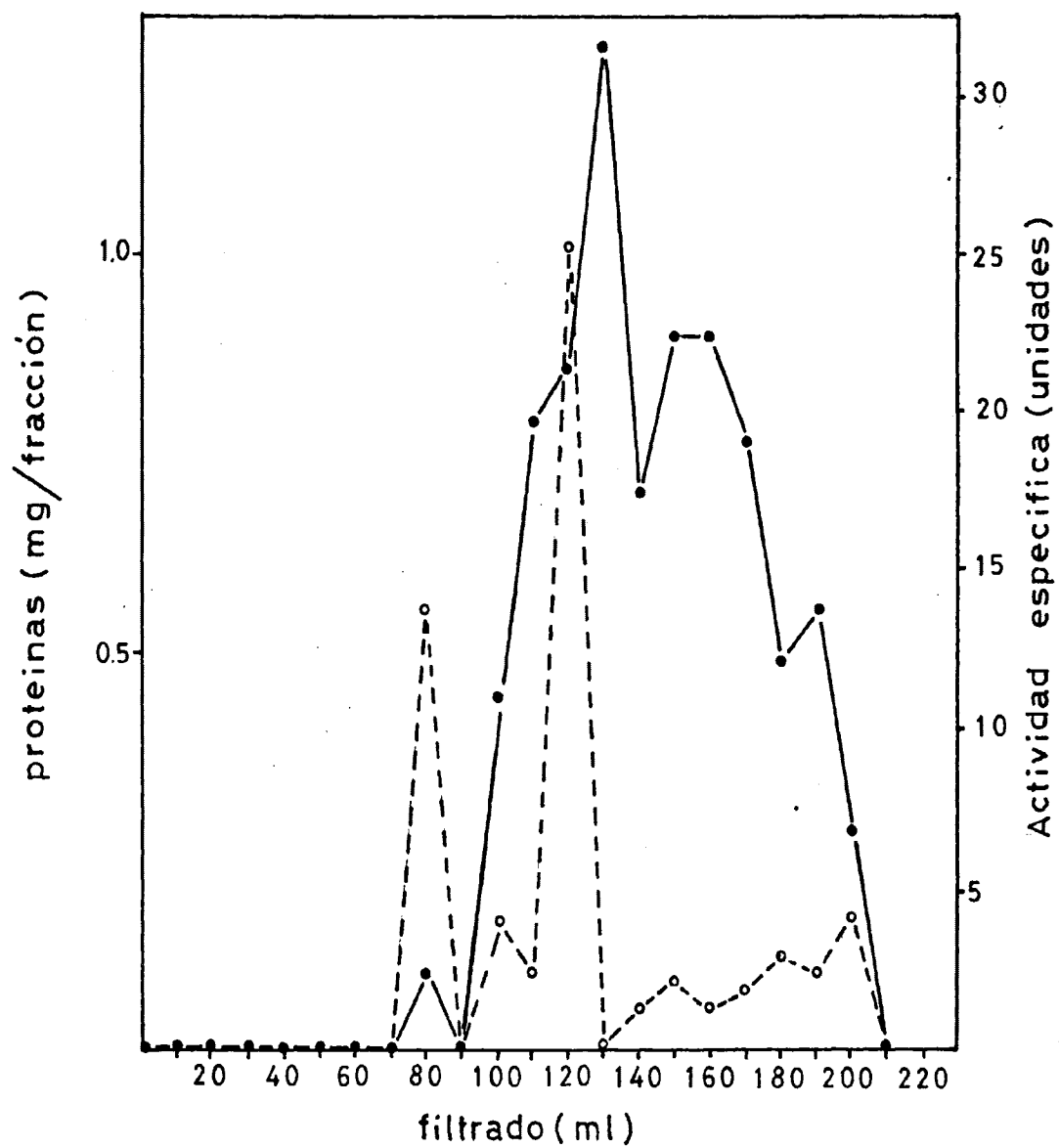


Figura 26 - Diagrama de elución a través de Sepharosa 6B de una muestra de ureasa cristalina incubada con ácido caperático; (•) proteína y (o) actividad específica.



En la tabla 11 se observa que considerando la actividad ureásica del talo intacto (0,08 unidades) el 100% al micobionte le corresponde 53,75% de actividad (0,043 unidades) y al ficobionte 46,25% restante (0,036 unidades).

TABLA 10

Inactivación de ureasa por sustancias liquénicas

Tratamiento	mg proteína	Recuperación	Actividad específica (unidades)	Actividad total	Inactivación (%)
Control	9,87	98,7	43,07	425,06	—
Atranorina	9,35	93,5	16,10	150,60	62,62
Acido lecanórico	8,12	81,2	13,00	105,60	69,82
Acido caperático	8,08	80,8	7,61	61,50	82,34

TABLA 11

Localización de la actividad ureásica en talo de Parmelia
roystonea micobionte y ficobionte

Fracción	Actividad ureásica (unidades)	%
Talo	0,080	100
Micobionte	0,043	53,75
Ficobionte	0,036	46,25

3. 2. - Cladonia verticillaris.

3. 2. 1. - Descripción de la especie.

Cladonia verticillaris (Raddi) Fr. (77). Talo pri
mario grande de 4 a 8,5 centímetros de longitud. Pódecios
con limbo sifonado, aplanados, con rayas bien distintas
en forma de "V" (Figura 27). KOH (+) positivo. Conceptá
culo del picnoconidio con base constricta. Picnoconidio
en muchos casos curvo. Limbo confluyente sifonado, dilata
do, circular de 7 - 14 milímetros (Figura 28).

3. 2. 2. - Síntesis de ureasa.

De la comparación de los datos de actividad ureási
ca en Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris, ambos
líquenes difieren en cuanto al período de incubación y las
horas de tratamiento, pues para Cladonia verticillaris, en
obscuridad y luz, solamente se consigue una mayor activi-
dad ureásica cuando llegamos a las ocho horas de incuba-
ción (Figura 29). Inicialmente no existe actividad en la
hora cero, consiguiéndose una actividad ureásica a la dos
horas, un poco mayor en luz que en obscuridad; en la cuar
ta hora ocurre contrario, con una mayor actividad en obs

Figura 27 - Verticilos de Cladonia verticillaris vistos al
microscopio de barrido (X650).

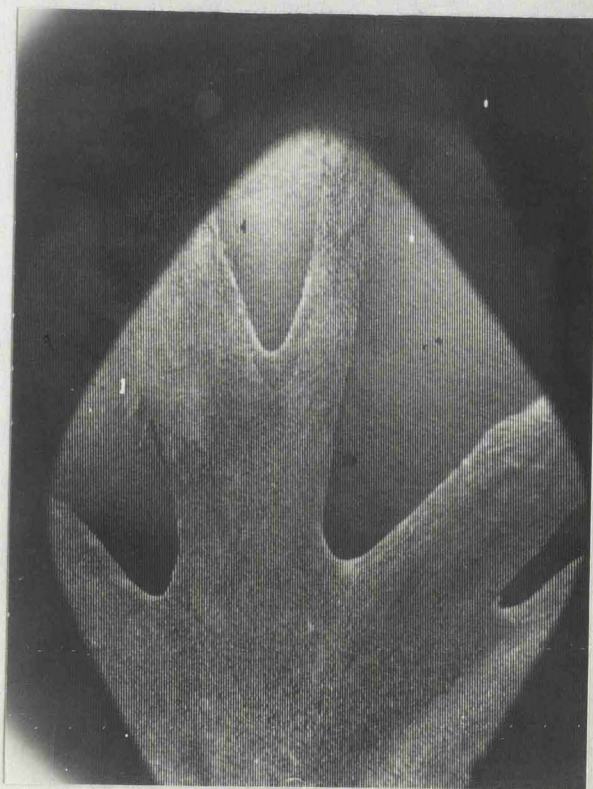
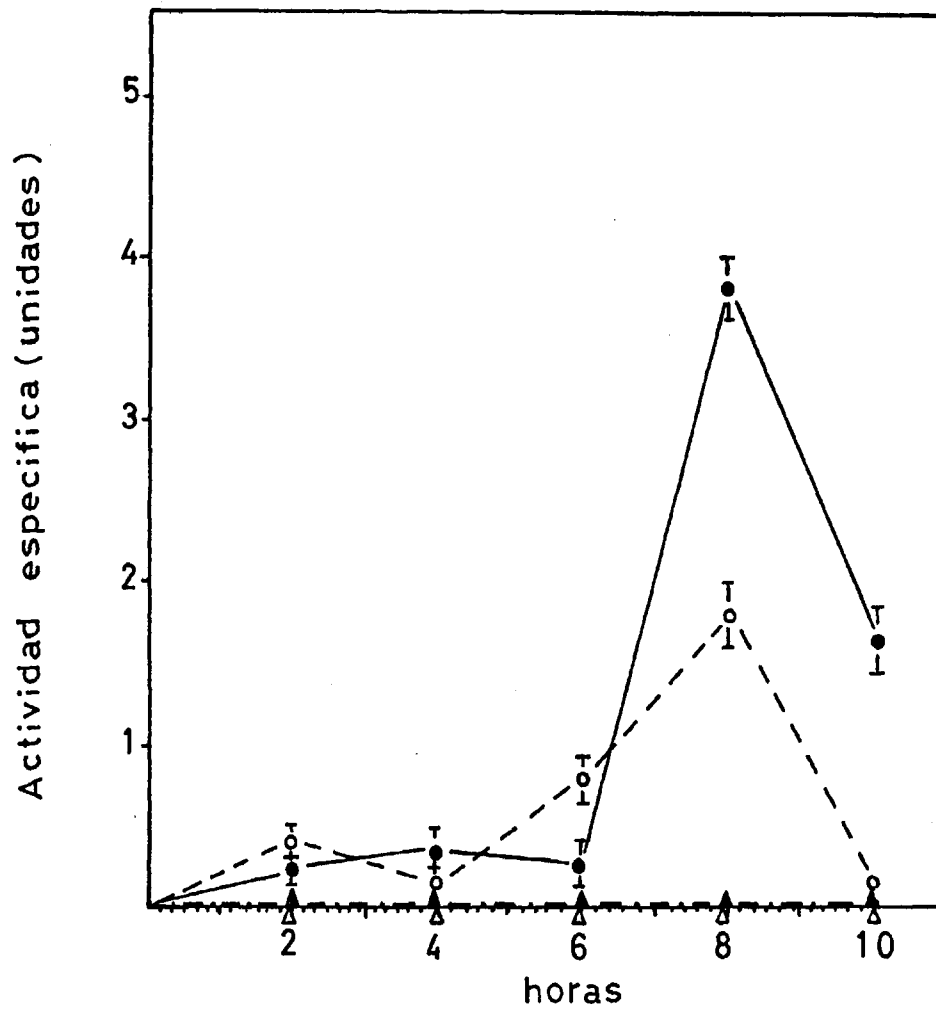


Figura 28 - Cladonia verticillaris en mm.



Figura 29 - Síntesis de ureasa de Cladonia verticillaris;
(●) oscuridad; (○) luz; (▲) oscuridad y adición
de actinomicina D, (△) oscuridad y adición de
cicloheximida, (■) oscuridad y adición de cloran
fenicol.



curidad y un descenso de la actividad en luz. En la sexta hora existe una marcada actividad en luz y una pequeña actividad en oscuridad, y en la octava hora una actividad ureásica marcada en oscuridad y un poco menos en luz, existiendo un descenso a cero en luz y un descenso en oscuridad.

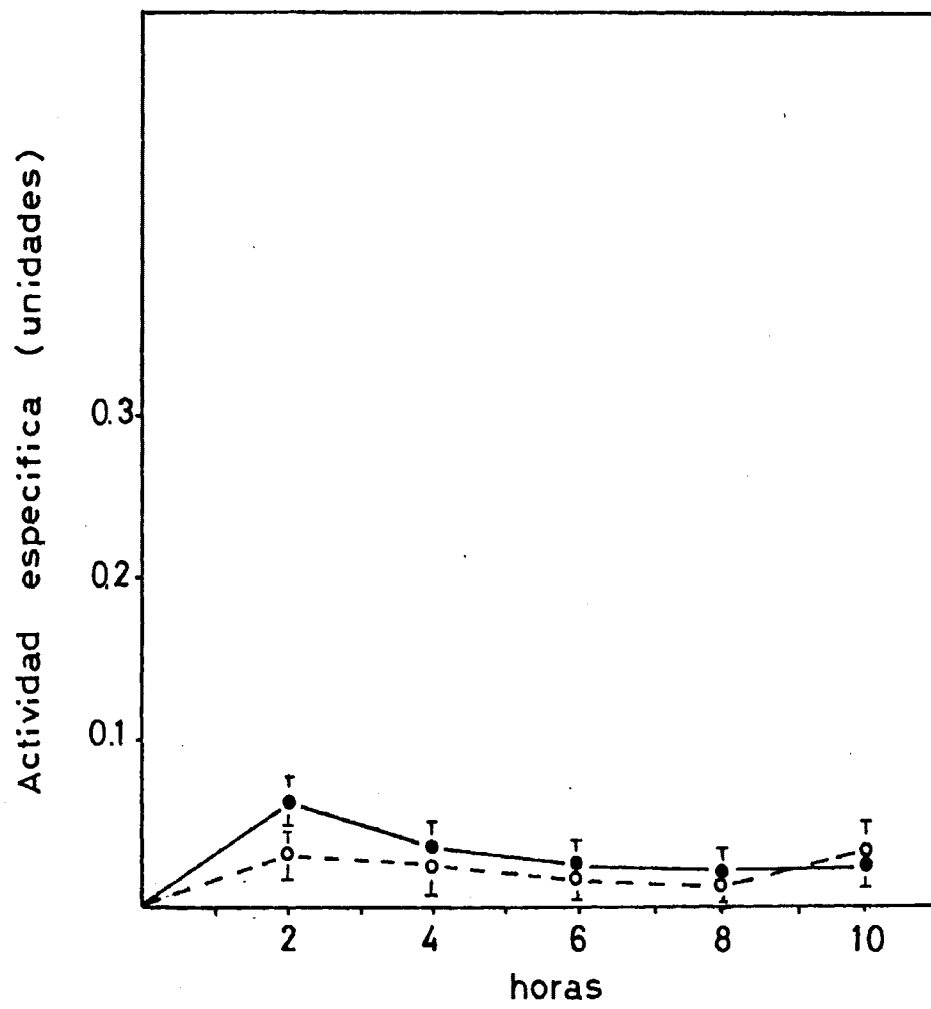
Cuando utilizamos actinomicina D, cloranfenicol y cicloheximida en los tratamientos, incubando durante diez horas, la actividad ureásica no se desarrolla para todo el tiempo de tratamiento.

En el momento que dializamos las muestras los resultados fueron, que hubo una actividad ureásica.

Una vez dializadas las muestras los resultados obtenidos fueron de un máximo de actividad a la cero hora seguido de un gran descenso entre la hora cero y dos seguido de un pequeño descenso entre las dos y cuatro horas a partir de la cual se anula casi la actividad ureásica.

En la figura 30 se demuestra que el enzima puede ser excretado al medio en una pequeña proporción, no existiendo diferencias apreciables para los tratamientos en luz y oscuridad.

Figura 30 - Excreción de ureasa de *Cladonia verticillaris*;
(●) oscuridad y (○) luz.





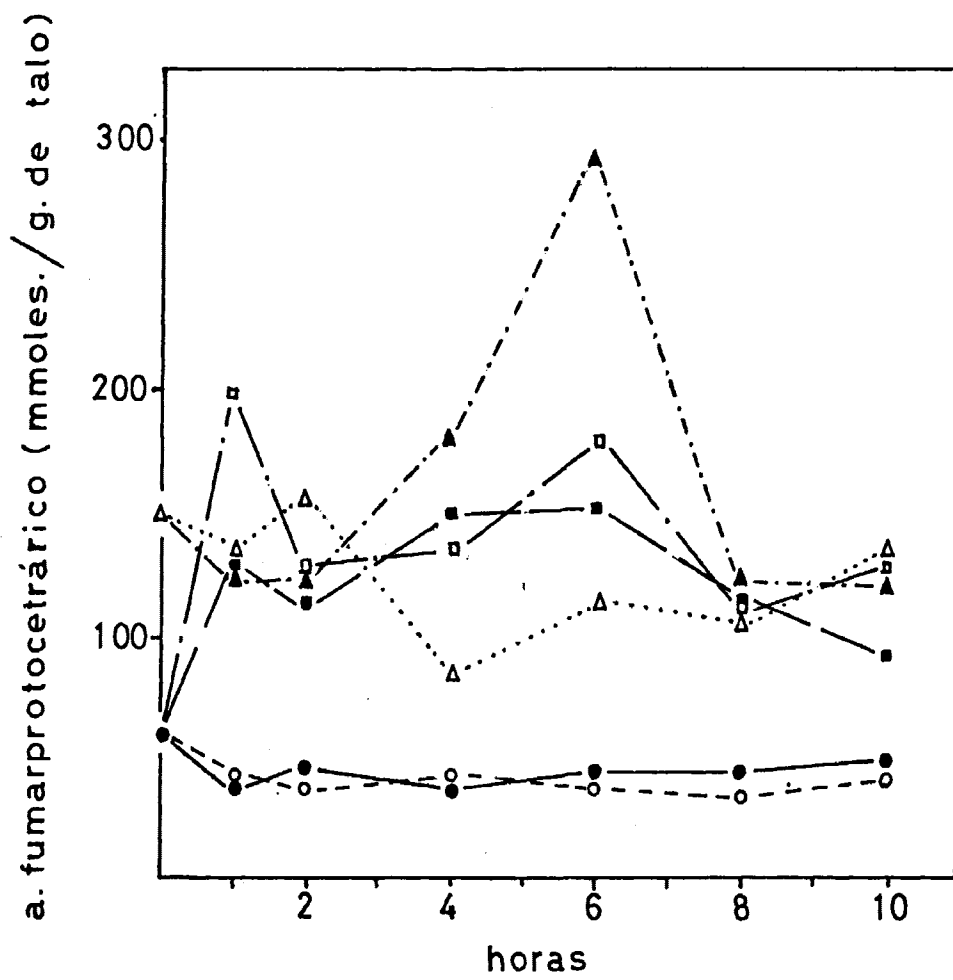
3. 2. 3. - Evolución del ácido fumarprotocetrárico.

La determinación del proceso de síntesis del ácido fumarprotocetrárico se realizó utilizando talo liquórico, el cual se incubaba con solución de urea 40 mM en tampón fosfato 75 mM, pH 6,9, sometiénolo a luz u oscuridad. Se midió la cantidad del ácido fumarprotocetrárico, durante las diez horas que duró la experiencia, en el medio de incubación, lavado del talo y macerado posterior de éste.

Los resultados obtenidos en estas condiciones se muestran en la figura 31. En ella se puede observar que, bajo condiciones de oscuridad, los mayores niveles de ácido fumarprotocetrárico se observan en el lavado, mostrando en este caso un máximo a las 6 horas de tratamiento. Respecto a las concentraciones encontradas en el medio son paralelas a las del lavado aunque cuantitativamente inferiores. Los niveles del ácido fumarprotocetrárico hallados en el macerado son inferiores a los casos anteriores y constantes a lo largo del periodo que duró la experiencia.

Los datos encontrados cuando las condiciones son de iluminación continua indican un comportamiento idéntico a los de oscuridad, en cuanto al medio y lavado se refieren y casi idénticos en el macerado.

Figura 31 - Evolución de ácido fumarprotocetrárico en Cladonia verticillaris valorado en el medio de incubación (■--■) oscuridad, (□--□) luz, en el lavado superficial del talo (▲---▲) oscuridad, (△.....△) luz, en el macerado de talo lavado (●—●) oscuridad, (○-----○) luz.



3. 2. 4. - Purificación y caracterización de la ureasa.

El extracto libre de células de Cladonia verticillaris fué sometido a diversos tratamientos según métodos y en seguida se precipitó con $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ hasta el 60% de saturación. Las proteínas del precipitado se adsorben en gel de fosfato cálcico y se eluye la fracción de mayor actividad específica con tampón fosfato de 0,1 mM de pH 6,9. Esta fracción de pasa por una columna de Sephadex G 200 equilibrando con el mismo tampón, con el que también se eluye. La fracción de mayor actividad corresponde a los 100 ml de filtrado. Esta fracción se filtra con Sepharosa 6B, eluyéndose la mayor actividad a los 130 ml.

El proceso de purificación se controló valorando en todos los pasos de actividad ureásica. Los resultados se muestran en la tabla 12. En ella se puede observar que recuperación del enzima, considerada como el porcentaje respecto a la actividad total, disminuye a lo largo del proceso de purificación; es decir, hay pérdida de moléculas del enzima a favor de la obtención de una preparación más purificada. Este hecho se muestra en la última columna de la tabla donde se el máximo grado de purificación conseguido y definido por el tanto por uno de la actividad específica, fué de 311,45.

TABLA 12

	Volumen (ml)	mg proteína/ml de extracto	mg proteína totales	Actividad específica	Actividad total	Recup. %	Purificación
Extracto libre de células	600	1,62	972,00	0,062	60,26	100	—
Precipitación del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a 60 % de saturación	100	0,49	49,30	0,09	4,43	7,35	1,45
Eluido de gel Fos.Cal. con tampón 0,1 mM	10	0,44	4,40	0,91	4,00	6,63	14,67
Columna Sephadex G-200 fracción 10	10	0,047	0,47	1,27	0,60	0,99	20,48
Columna Sepharosa 6B fracción 13	10	0,003	0,03	19,31	0,56	0,92	311,45

Hay que destacar el alto poder de resolución de la columna de Sepharosa 6B donde no se produce casi pérdida de moléculas proteicas y paralelamente se consigue un grado de purificación muy elevado.

La fracción 13 de la columna de Sepharosa 6B se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5%) resolviéndose en una sola banda.

3. 2. 5. - Efecto sobre actividad enzimática.

La incubación de ureasa con ácido fumarprotocetrárico a 1 mg/10ml a 37° C provoca una inactivación del enzima ya en los primeros cinco minutos de tratamiento.

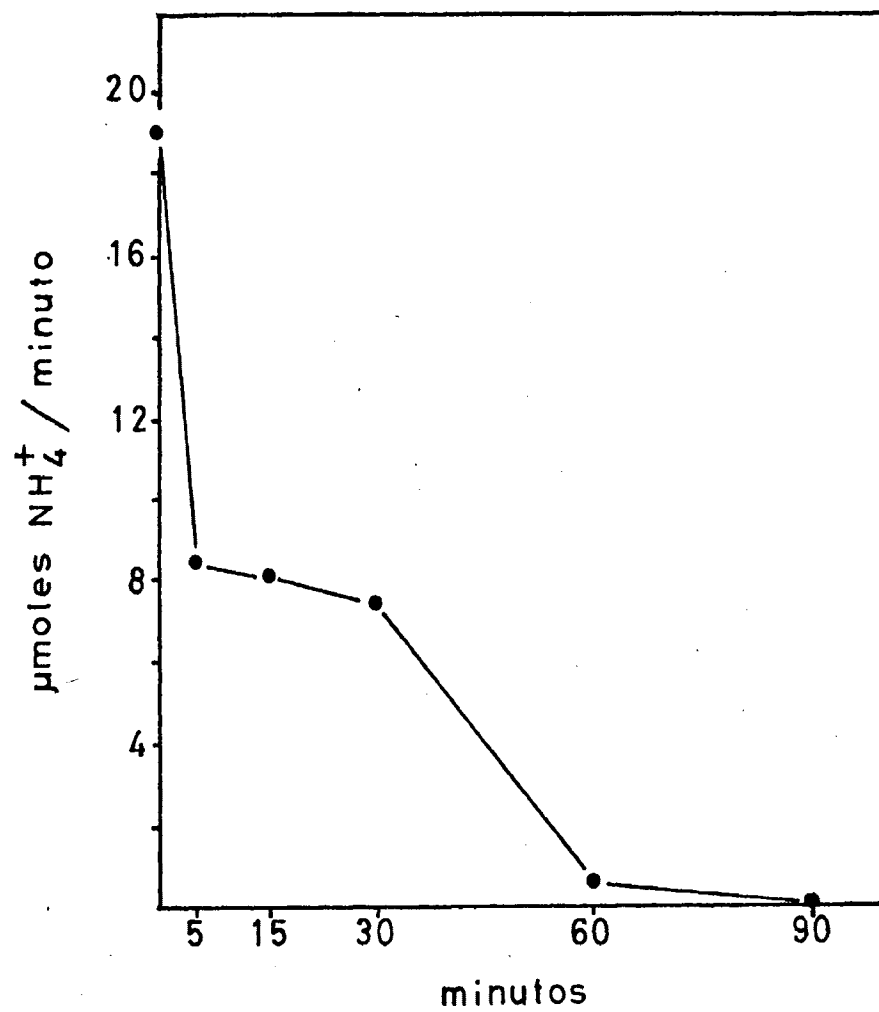
Como se observa en la figura 32, la velocidad de reacción ureásica disminuye desde 19 $\mu\text{moles de NH}_4^+/\text{minuto}$ a 8 $\mu\text{moles de NH}_4^+/\text{minuto}$ para los cinco minutos de incubación con ácido fumarprotocetrárico.

Para mayores tiempos de incubación la velocidad de reacción disminuye hasta anularse completamente a los noventa minutos de tratamiento.

3. 2. 6. - Formación de agregados.

Como en el caso de Parmelia roystonea, se determinó el

Figura 32 - Pérdida de actividad de una ureasa cristalina comercial en función del tiempo de tratamiento por disoluciones salinas del ácido fumarprotocetrárico.



efecto del ácido fumarprotocetrárico de Cladonia verticillaris sobre ureasa.

En la figura 33 se representa la filtración a través de Sepharosa 6B de ureasa incubada con ácido fumarprotocetrárico en la condición que previamente se ha especificado.

Como se observa en la figura 33, las formas de ureasa predominantes después del tratamiento con esta sustancia liquénica son de menor peso molecular que la ureasa nativa, eluyendo fundamentalmente a 160 ml y 210 ml de filtrado.

3. 2. 7. - Localización del enzima.

Para determinar cual de los simbioses era responsable de la actividad ureásica de Cladonia verticillaris, de un talo incubado durante 8 h en urea 40 mM se separaron los ficobiontes y micobiontes, valorándose a continuación la actividad ureásica de los dos simbioses.

En la tabla 13 se observa que el micobionte le corresponde el 25,64% de actividad (0,4 unidades) y al ficobionte el 74,35% restante (1,16 unidades).

Figura 33 - Diagrama de elución de ureasa cristalina incubado con ácido fumarprotocetrárico a través de Sepharosa 6-B (●) proteína; (○) actividad específica.

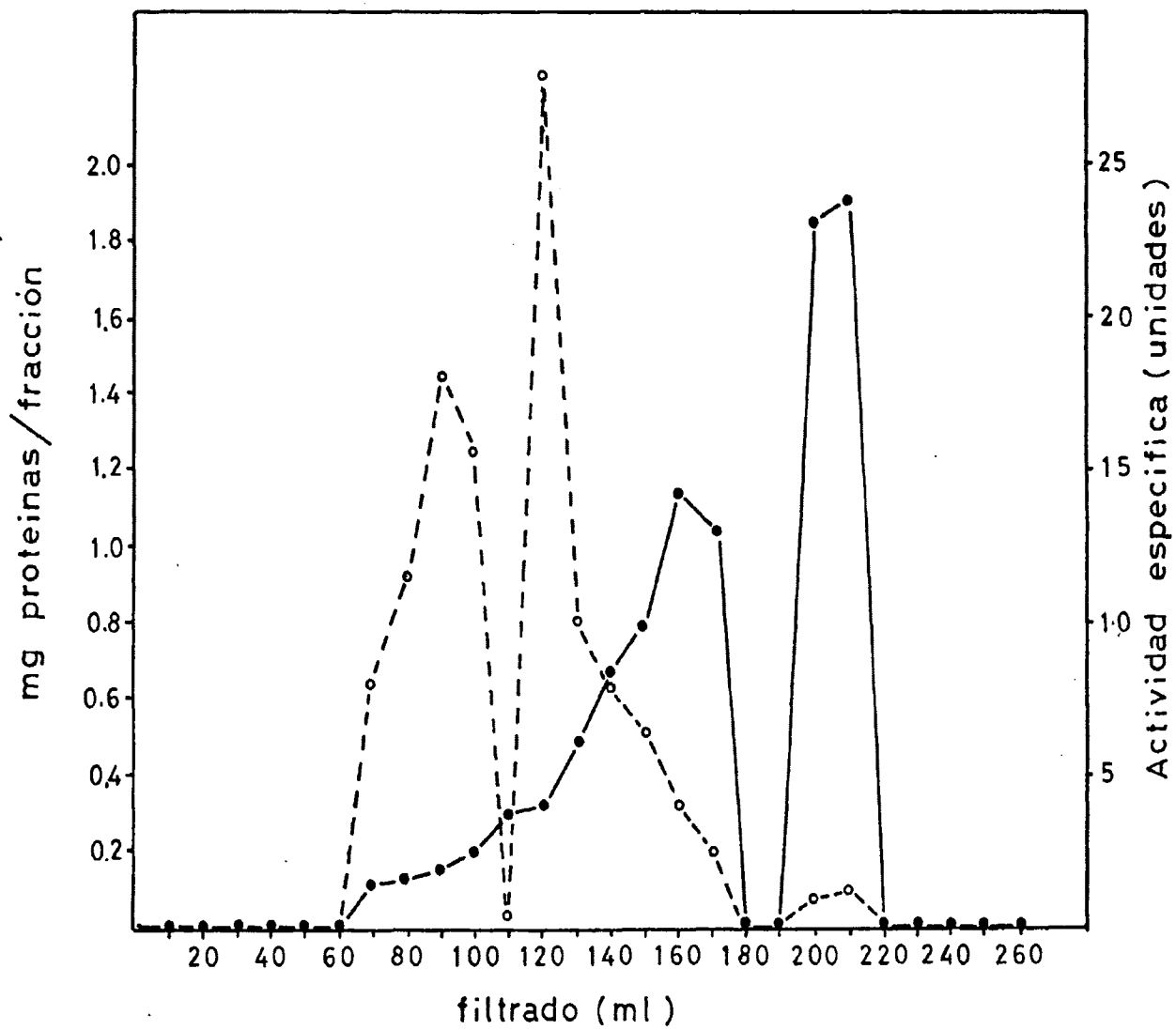


TABLA 13

Localización de la actividad ureásica en talo de Cladonia
verticillaris

Fracción	Actividad	%
Micobionte	0,4	25,64
Ficobionte	1,16	74,35
Total	1,56	100

4. DISCUSIÓN.

La distinción de una nueva especie para la ciencia es muy difícil, al tener en cuenta la selección natural y por lo tanto la influencia del medio ambiente; por otra parte, muchos estudiosos de la taxonomía vegetal nos hacen ver de una forma muy clara las interacciones entre el medio ambiente, el genotipo y su importancia en la taxonomía y evolución vegetal.

Después de mucho tiempo de observación, se ha mostrado a los botánicos que las plantas pertenecientes a una misma especie no son exactamente semejantes las unas a las otras.

Linneo reconoció la existencia de tal variedad, pero él la interpretó únicamente, o casi, en función de la acción del medio.

Después del redescubrimiento de las leyes de Mendel, hacia 1900, el estudio de la variación infraespecífica estuvo justificado por los análisis taxonómicos y por las consideraciones relativas al fenómeno de la evolución.

Después de estudiar monográficamente el género Alector, Brodo y Hawksworth (96) llegaron a la conclusión de que muchas especies poseen aberraciones morfológicas y químicas.

Luego Brodo (97) concluyó que los rasgos distintivos de un organismo pueden contarse, medirse e catalogarse lo que permite comparar con las de otro vegetal.

En el caso de Parmelia roystonea, la diferencia fundamental para la separación de una nueva especie, se centra; la distinción del soledio y también la presencia de ácido caperático como indicador de la quimiotaxonomía.

En las especies estudiadas de Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris, la actividad ureásica se desarrolla prácticamente en la oscuridad cuando el talo liquénico es incubado en urea, alcanzando en la segunda especie un valor aproximadamente de 60 veces superior al que alcanza en la primera especie. En condiciones de iluminación, el desarrollo de la actividad enzimática alcanza niveles discretos para anularse con posterioridad. Como se verá después, esta anulación está en función de los ácidos liquénicos sintetizados paralelamente. En la utilización de inhibidores de la síntesis de proteínas en Cladonia verticillaris establece definitivamente que el enzima se sintetiza de novo ya que en presencia de los antimetabolitos no aparece actividad enzimática en todo el tiempo de la experimentación.

En Parmelia roystonea los datos obtenidos no son de finitorios aunque a partir de la cuarta hora de incubación

la actividad enzimática puede considerarse nula; esto haría que tampoco pueda definirse como centro de síntesis para los enzimas el citoplasma o los orgánulos. Por tanto, definimos un fenómeno de inducción de ureasa por urea deshechando la hipótesis de que podría tratarse de una activación de un enzima inactivo preexistente.

Nuestro interés está centrado preferentemente en el tiempo de anulación de la actividad enzimática, que es mucho más definida en condiciones de iluminación. En este sentido hemos observado, como en otras especies estudiadas Evernia prunastri (69) y Lobaria pulmonaria (95) que la síntesis activa de ácidos liquénicos es un fenómeno paralelo a la desaparición de actividad ureásica. Por ejemplo, en la tabla 9 se ofrecen los resultados obtenidos sobre la evolución del contenido en atranorina y ácidos lecanórico y caperático de Parmelia roystonea incubada sobre urea en oscuridad y en luz; en todos los casos se observa que, a tiempos variables, se produce un incremento en la concentración de los tres ácidos que pueden ser posteriormente excretados al medio. Para el ácido lecanórico, el máximo contenido en talo se alcanzó en la segunda hora, para en la sexta el ácido caperático y en la cuarta para atranorina. Los tres ácidos comienzan a excretar al medio a partir de la segunda hora de incubación, pudiéndose sospechar incluso que, para atranorina y lecanó-

rico, al menos existe un cierto porcentaje de destrucción de los ácidos no sintetizados. Si se intenta establecer la correspondencia entre contenido en ácidos liquénicos y actividad ureásica se observa que, para oscuridad, la máxima desaparición de actividad enzimática, que se da la sexta hora de incubación (Figura 17), se corresponden con las mínimas cantidades de atranorina y ácido lecanórico y con la máxima cantidad de ácido caperático. Estos datos serían igualmente válidos en talos incubados en luz.

En el caso de Cladonia verticillaris, la máxima producción de ácido fumarprotocetrárico se observa en la sexta hora de incubación coincidente en oscuridad con el mínimo de actividad enzimática; el máximo desarrollo posterior de actividad a la octava hora de incubación coincide con una sensible disminución en el contenido en el ácido liquénico. Es de notar que, para Cladonia verticillaris, la evolución del ácido fumarprotocetrárico es constante en el talo.

Tenemos entonces una relación inversa entre actividad ureásica y contenido en ácido liquénico. En las figuras 19 a 22 y 32 se demuestra que una ureasa cristalina es rápidamente inactivada in vitro por cualquiera de los cuatro ácidos liquénicos.

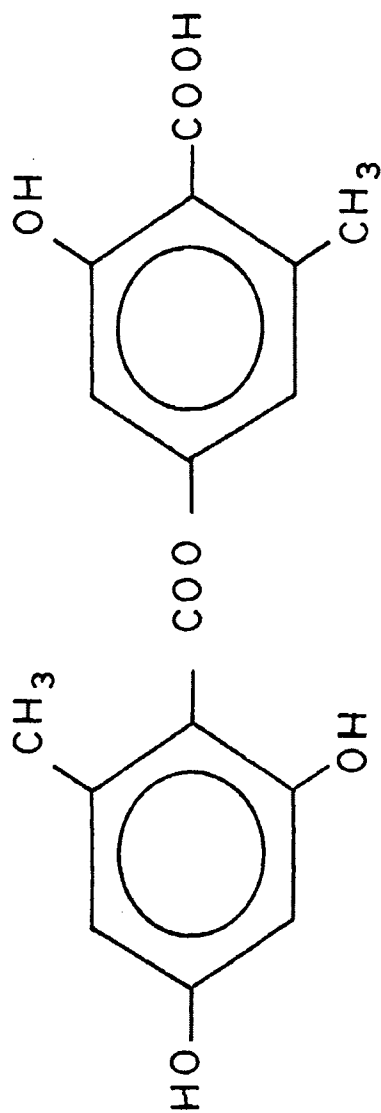
Las estructuras de estos cuatro ácidos liquénicos se dan en las figuras 34, 35, 36 y 37; en ellas se observa que el ácido lecanórico es un p-dépsido del orcinol, la atranorina un p-dépsido del β -orcinol, el ácido fumarprotocetrárico es un dépsido del β -orcinol, y el ácido caperático que es un ácido alifático. La estructura fenólica de los tres primeros podría indicar en principio que su acción como inactivador de ureasa puede estar relacionada con la observada para el ácido L-úsico (68) salvando las distancias que puede haber entre éste, fruto de una ciclación floroglucinólica y los dépsidos y depsidonas fruto de una ciclación orcelínica.

La inactivación de ureasa por ácido úsico, como se ha dicho anteriormente, se basa en un mecanismo de agregación molecular que implica monómeros de un peso molecular de 16.000 (66) o en casos oligómeros de peso molecular 83.000 (67).

Las figuras 24, 25 y 33 nos indican que el mecanismo parece idéntico, al menos en lo que concierne a la atranorina y el ácido lecanórico.

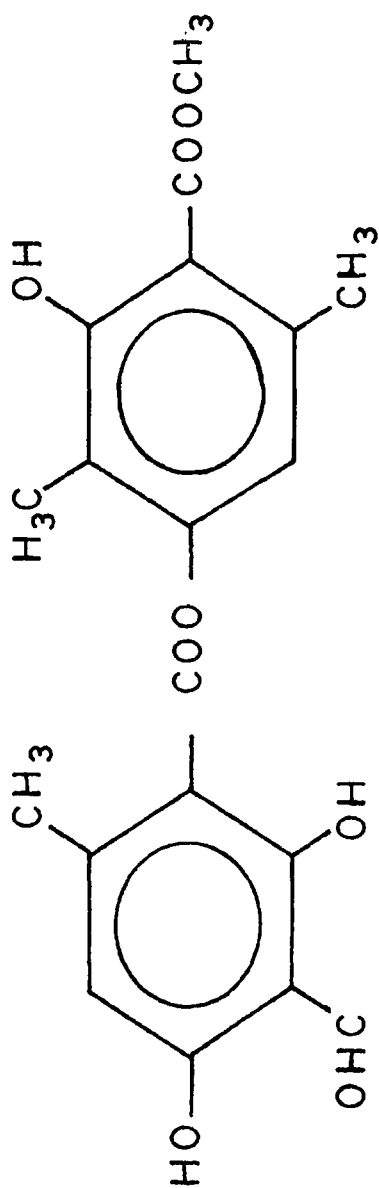
Para la atranorina se observa la aparición de un pico de elución a través de Sepharosa 6-B a los 10 ml de filtrado, lo que implicaría polímeros de pesos moleculares superiores a 800.000; también se observa la aparición de oli

Figura 34 - Fórmula estructural de ácido lecanórico.



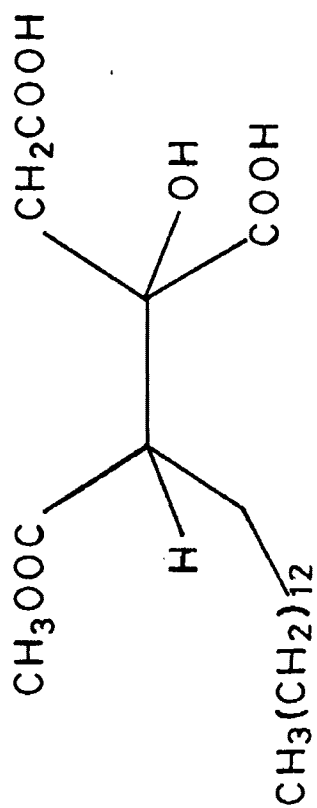
Acido Lecanórico

Figura 35 - Forma estructural de la atranorina.



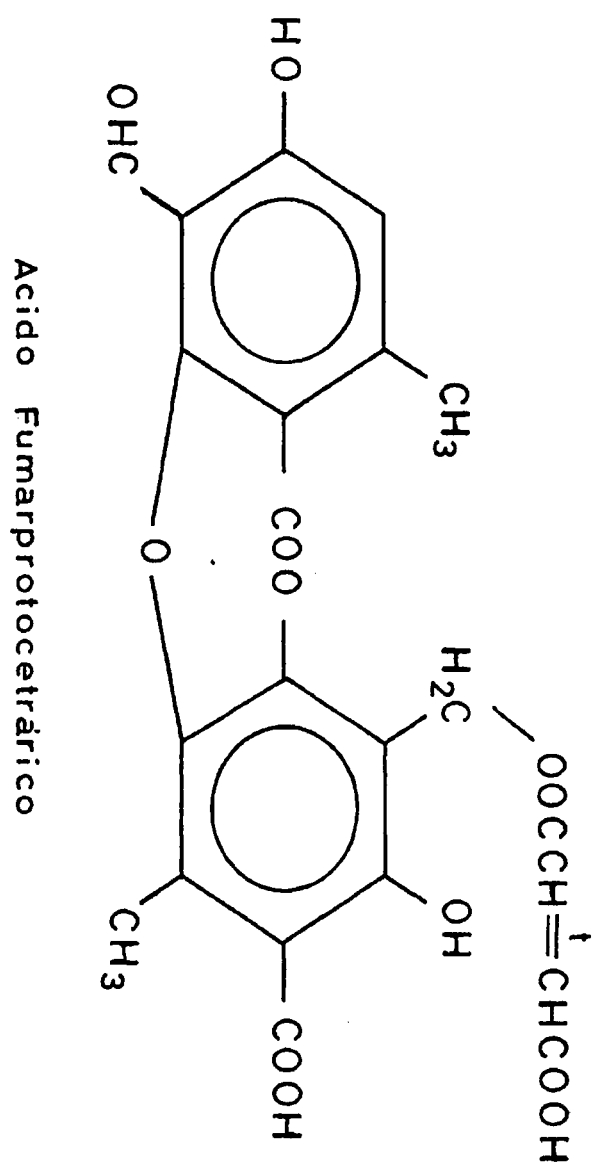
Atranórina

Figura 36 - Fórmula estructural del ácido caperático.



Acido Caperático

Figura 37 - Fórmula estructural del ácido fumarprotocetrárico.



5. CONCLUSIONES.

1. - Parece ser que Parmelia roystonea es una quimioespecie que se separa de Parmelia subrudecta por la distinta distribución de los soredios y la presencia de ácido caperático; por lo tanto una nueva especie bien definida morfológica y químicamente.
2. - En Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris la ureasa es un enzima inducible por urea.
3. - La síntesis de ureasa es impedida en Parmelia roystonea por actinomicina D, cicloheximida y cloranfenicol. Ocurre lo mismo en Cladonia verticillaris, pero con mucho más intensidad.
4. - La síntesis de ureasa se lleva a cabo preferentemente en condiciones de oscuridad mientras que altas intensidades de iluminación provoca efecto inhibitorio.
5. - Las sustancias liquénicas depositadas en el córtex de Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris y extractables por lavado acetónico muestran una evolución inversa a la actividad ureásica.

6. - Las sustancias liquénicas de Parmelia roystonea, ácido lecanórico, ácido caperático y atranorina, así como ácido fumarprotocetrárico de Cladonia verticillaris, provocan una rápida inactivación de ureasa cristalina comercial.
7. - La inactivación de ureasa por atranorina, ácidos lecanórico, caperático y fumarprotocetrárico se basa en un mecanismo de agregación molecular que en atranorina implica polímeros de pesos moleculares superiores a 800.000. Cuanto al ácido fumarprotocetrárico se observa la despolimerización a oligómeros. El ácido caperático es el que produce la máxima inactivación con los mínimos cambios moleculares.
8. - La actividad ureásica se encuentra en ambos simbioses de Parmelia roystonea y Cladonia verticillaris solamente con una distinción que en Parmelia roystonea, la actividad está dividida entre micobionte y ficobionte, mientras que en Cladonia verticillaris el ficobionte tenía la mayor actividad y el micobionte la menor.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- XAVIER FILHO, L., RIZZINI, C.T. (1976): Manual de Lique
nologia Brasileiro. - Universidad Federal
de Pernambuco, 431p.
- 2.- BORNET, E. (1873): Recherches sur les gonidies des li-
chens. - Ann. Scienc Nat. Bot. Ser. 5 vol.
17 - Paris.
- 3.- ZAHLBRUCKNER, A., (1921/1940): Catalogus Lichenum Uni-
versalis. - Vol. I - X - Leipzig.
- 4.- JUELLE, H. (1892): Recherches physiologiques sur les
Lichens. - Revue. gen. Bot. 4. 49.
- 5.- DE CANDOLLE, A.P. (1798): First article on the method
of nutrition of Lichens. - I. Phys.Chem.
Hist. Nat. 47 - 107.
- 6.- SMITH, A.L. (1921): Lichens. - Cambrigde Univ. Press.
- 7.- SCHAUER, T. (1965): Ozeanische Flechten in Nordalperaum:
Port. Act. Biol. (B) 8: 17.
- 8.- SERNANDER, R.(1908): Om några former för art-och varie-
tets-bildning hos lafvarna: Sv. Bot. Tidskr
97: 135.
- 9.- KERSHAW, K.A., MILLBANK, W. (1969): A controlled environ-
ment lichen growth chamber. - Lichenologist
4: 83.

- 10.- HARLEY, Y.L., SMITH, D.C. (1956): Sugar absorption and surface carbohydrase activity of *Peltigera polydactyla* (Neck) Hoffm.-Ann. Bot. N.S. 20: 513.
- 11.- SMITH, D.C., DREW, E.A. (1965): Studies in the physiology of Lichens. V - Translocation from the algal layer of the medulla in Peltigera polydactyla.- New Phytol. 64: 781.
- 12.- QUISPÉL, A. (1943-45): The mutual relations between algae and fungi in Lichens.- Rec.Trav.Bot. Neerl. 40: 413.
- 13.- ZEHNDER, A. (1949): Ueber den Einfluß von Wachstumsstoffen auf Flechenbildner. - Ber Schweiz. Bot. Ges. 59: 201.
- 14.- AHMADJIAN, A. (1965): The Lichens Symbiosis - Blaisdell, Waltham, Mass.
- 15.- JAAG, O. (1929): Recherches expérimentales sur les gonidies des lichens appartenant aux Genres Parmelia et Cladonia - Bull.Soc.Bot. Genève 21: 1.
- 16.- QUISPÉL, A. (1959): Lichens. In. Handbuch der Pflanzenphysiologie. - Bot. XI hrsg. von W. Ruthland Springer, Berlin.

- 17.- HENRIKSSON, E. (1964): Studies in the physiology of the lichen Collema. V - Effect of medium, temperature and pH on growth of the mycobionte.- Sv. Bot. - Tidskr. 58: 361.
- 18.- WARÉN, H. (1918-19) - Reinkulturen von Flechtengonidien. Öfvers. Finska Vetensk. Soc. Förhandl. 61. 1.
- 19.- DE NICOLA, M.C., DI BENEDETTO, G. (1962): Recherche preliminari sui pigmenti nel ficobionte lichenico Trebouxia decolorans Ahm. III. Chlorofille e Carotenoidi. Boll. Ist. Bot. Univ. Catania 3: 22.
- 20.- CRISTIN, R.J. (1977): Sustancias liquénicas como material de reserva para Evernia prunastri.- Tesina de Fisiologia Vegetal - Catedra de Fisiologia Vegetal - Universidad Complutense de Madrid.
- 21.- ESTEVEZ, M.P., MARTINEZ, M., VICENTE, C. (1977): Photo-destruction of β -carotene and Protection of the Photo-oxydation by Chloroatranorine - Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 34, 309.
- 22.- LANCE, O.L. (1953): Hitze-und Trockenresistenz der Flechten in Beziehung zu ihrer Verbreitung Flora 140: 39.

- 23.- HENRIKSSON, E. (1961): Studies in the physiology of the lichen Collema IV. The occurrence of polysaccharides and vitamins outside the cells of the phycobionte. Nostoc sp. *Physiol. Plant.* 14: 813
- 24.- DEW, E.A., SMITH, D.C. (1967): Studies in the physiology at lichens. VII - The physiology of the Nostoc symbiont of Peltigera polydactyla compared with cultured and free-living forms. *New Phytol.* 66: 379.
- 25.- TOBLER, F. (1925): *Biologie der Flechten* - Borntraeger, Berlin.
- 26.- HALE, M.E. (1958): Vitamin requirements of three lichen fungi. *Bull. Torrey Bot. Club.* 85: 182.
- 27.- AHMADJIAN, V. (1964): Further studies on lichenized fungi - *Bryologist.* 67: 87.
- 28.- GROSS, M., AHMADJIAN, V. (1966): The effects of L-amino acids on the growth of two lichen fungi - *Sv. Bot. Tidskr.* 60: 74.
- 29.- TOMASELLI, R. (1959): Di ameniacidi como fonte de azoto nella crescita, in vitro di microsimbionte lichenici *Atti Ist. Bot. Univ. Lab. Crittogam. Pavia* 16: 180.

- 30.- AM ENDE, I. (1950): Zur Ernährungsphysiologie des Pilzes Xanthoria parietina. Arch. Mikrobiol. 15: 185.
- 31.- HALE, M.E. (1967): The Biology of the Lichens - Arnold London.
- 32.- AHMADJIAN, V.(1962): Investigations on lichen synthesis Amer. J. Bot. 49: 277.
- 33.- BEDNAR, T.W., HOLM-HANSEN, C. (1964): Biotin liberation by the lichen alga Coccomyxa species and by Chorella pyrenoidea - Pl. Cell. Physiol. 5: 297.
- 34.- FURNAI, F., LUCIANI, F.(1962): Esperienze sulla crescita dei micobionti in Sarcogyne similis e Acarospora fuscata in coltura pura su vari substrati. Boll. Ist. Bot. Univ.-Catania 3: 39.
- 35.- HESS, D. (1959): Untersuchungen über die Bildung von Phenolkörpern durch isolierte Flechtenpilze Z. Naturfach. 14b: 345.
- 36.- HALE, M.F. (1961): Lichen Handbook - Smithsonian Inst.- Washington.
- 37.- HENRIKSSON, E. (1958): Studies in the physiologie of the lichen Collema II - A preliminary report the isolated fungal partner with special

regard to its behaviour when growing together with the symbiotic alga. - Sv. Bot.Tidskr. 52: 391.

- 38.- STEINER, M. (1955): Wachstums - und Entwicklungsphysiologie der Flechten. In: Handbuck der Pflanzenphysiologie, Bd. V/I hrsg. von W.Ruhland. Springer, Berlin.
- 39.- MISH, L.B. (1953): Biological studies of symbiosis between the alga and fungus in the rock lichen Umbilicaria populosa. Diss. Cambridge/Mass.
- 40.- THOMAS, E.A. (1939): Uher die Biologie von Flechtenbildnern. Beitr. Krypt. Schweiz 9: 1.
- 41.- AHMADJIAN, V. (1963): The fungi of lichens-Scient.Amer. 208: 122.
- 42.- CASTLE, H., KUBSCH, F. (1949): The production of usnic, didymic and rhodocladonic acids by the fungal component of the lichen Cladonia cristatella Arch. Biochem. 23: 158.
- 43.- KOMIYA, T., SHIBATA, S. (1969): Formation of lichen substances by mycobiontes of lichens. Chem.Pharm. Bull. - Tokio 17: 1305.
- 44.- KUROKAWA, S. (1971): ¹¹Results of isolation and culture of lichen fungi and algae. J. Jap. Bot. 46: 9.

- 45.- LEWIN, R.A. (1962): Physiology and Biochemistry of algae. Academic Press. - New York.
- 46.- RIED, A. (1960): Stoffwechsel and Verbreitungsgrenzen von Flechten II Wasser-und Submersionssresis tens von Krustenflechten benachbarter Stand orte. Flora 149: 345.
- 47.- SMITH, D.C. (1962): The biology of lichen thalli - Biol. Rev. 37: 537.
- 48.- BARKMAN, J.J. (1958): Phytosociology and ecology of cryptogamic Epiphytes. Van Gorcum, Assen.
- 49.- STOCKER, O. (1927): Physiologische und ökologische Untersuchungen and Laub-und-Strauchflechten Flora 21: 334.
- 50.- DICIONARIO GEOGRÁFICO BRASILEIRO (1967): Editorial Globo - Porto Alegre. 559p.
- 51.- KUCHLMANN, E. (1960): Os tipos de vegetação do Brasil. Anais da Associação dos Geógrafos Brasileiros. Vol. II - Tomo I.
- 52.- TAVARES, S.A. (1963): Contribuição para o estudo da cobertura vegetal dos tabuleiros do Nordeste.-Rev.do Club de Eng.de Pernambuco.AnoIX
- 53.- MOISSEJWA, E.M. (1961): Biochemical Proprieties of Lichens and their.Practical Importance,Moscow Izdatel'stvo Akademia Nouk CCCR. 82.

- 54.- SHAPIRO, I.A. (1976): Determination of urease activity in Lichens by a direct potentiometric method. Societ. Plant Physical. 23: 712.
- 55.- ROTHMAN, B., SPIEGELMAN, S. (1954): On the origin of the carbon in the induced synthesis of B-galactosidase in Escherichia coli J. Bact. 68: 419.
- 56.- MEHT, S.L., NAIK, M.S., DAS, N.B. (1967): Induced Synthesis of urease in Azotacter vinelandii.- Ind. I. Biochem. 4: 194.
- 57.- JACOB, F., MONOD, J. (1961): Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of protein J. Mol. Biol. 3: 318.
- 58.- FISHBEIN, W.N., WINTER, T.S., DAVIDSON, J.D. (1965): Urease Catalysis. The Journal of Biological Chemistry vol. 240, 6, 2402.
- 59.- SUMNER, J.B. (1926): The recrystallization of urease. Biol. Chem. 70: 97.
- 60.- BAILLY, M., FENY, P., LEGER, N. (1967): Le dosage de l'urée dans les liquides biologiques a l'aide du p-diméthylaminobenzaldéhyde-Ann. Biol. Clin. 25, 10, 12, 1221-1232.
- 61.- SYRETT, P.J. (1962): Nitrogen Assimilation. In. Physiology and Biochemistry of Algae Academic Press. 171-188.

- 62.- RICHARDSON, D.H.S. (1973): Photosynthesis and Carbohydrate movement In: The Lichens. Edited by Ahmadjian, V. & Hale, M.E. 249 - 255.
- 63.- VICENTE, C. (1975): Fisiología de las sustancias líquénicas - Ed. Alhambra, 170p.
- 64.- MANSO, M.R. VICENTE, C. (1971): Acción del L-usnato sódico sobre la actividad ureásica de Proteus mirabilis - Microbiol. Españ. 24 - 123.
- 65.- VICENTE, C., GUERRA, H., VALLE, M.T. (1974): Formas inactivas de ureasa, de alto peso molecular producidas por L-usnato sódico. Rev. Españ. Fisiol. 30: 1.
- 66.- SEKITA, K., MANIYA, G. (1967): Primary structure and the mode of action of urease. Proceedings of the 7th International Congress of Biochemistry. Tokyo Abstracts IV 761.
- 67.- REITHEL, F.J., ROBINS, J.E., GORIN, G. (1964): A structural subunit molecular weight of urease.-Archives of Biochemistry and Biophysics 180: 409.
- 68.- VICENTE, C., AZPIROZ, A., ESTEVEZ, M.P., GONZÁLEZ, M.L. (1978): Quaternary structure changes and kinetics of urease inactivation by L-usnic

acid in relation to the regulation of nutrient transfer between lichen simbiots. Plant, Cell and Environment 1: 29.

- 69.- ESTEVEZ, M.P., VICENTE, C. (1978): Urease regulation in Evernia prunastri. The Bryologist. En prensa.
- 70.- ZOPF, W. (1907): Die Flechtenstoffe in chemischer Botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung. Jena 450p.
- 71.- ASAHINA, Y. (1934): Zur Systematik der Flechtenstoffe- Acta Phytochim. 8: 33.
- 72.- FISCHER, E. (1913): Synthese der lecanosäure und struktur Chem. Ber. 46: 502.
- 73.- ASAHINA, Y., SHIBATA, S., (1954): Chemistry of Lichen sustans, Japanese Society for the Promotion of Science, Tokyo - 240p.
- 74.- NYLANDER, W. (1866): Circa norum in studio Lichenum criterium chemicum, Flora 49: 198.
- 75.- ASAHINA, Y. (1943): Chemismus der Cladonien unter besonderer Berücksichtigung Japanischen Arten. J. Jap. Bot. 19: 227.
- 76.- ASAHINA, Y. (1952): Lichens of Japan Vol. II. Genus Parmelia. Reseach Inst. Nat. Res. Tokyo 169p.
- 77.- VAINIO, E. (1897): Monographia Cladoniarum universalis, Parts tertio - Act. Soc. Fau. et Flo. Fen. XIV-no. 1

- 78.- XAVIER FILHO, L., VICENTE, C. (1978): Avaliação espectrofotométrica dos ácidos lecanórico, caperático e atranorina em lavados etanólicos de Parmelia roystonea. Natulae Biologicae 2: 1.
- 79.- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDER, R.I. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.
- 80.- WARBURG, O., CHRISTIAN, W. (1941): Isolierung und Kristallization des Gärungsferments Enclase Bioche. Zeits. 310: 384.
- 81.- CONWAY, E.J. (1957): Microdiffusion Analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London.
- 82.- STANDARD METHODS (1955): American Public Health Ass. Inc. New York.
- 83.- HALE, M.E. (1959): New or interesting Parmelias from North and tropical America - Bryologist 62: 123.
- 84.- HALE, M.E. (1966): A revision of the South American Species of Parmelia determined by Lynge. Contributions from the United National Herbarium 36: 1.
- 85.- HALE, M.E., KUROKAWA, S. (1964): Studies on subgenus Parmelia. Contributions from United States - Herbarium 36: 121.

- 86.- HALE, M.E. (1974): Bulbotrix, Parmelina, Recilina and Xanthoparmelia, four new genera in Parmeliaceae (Lichens) - Phytologia, 28: 479.
- 87.- HALE, M.E. (1976): A monograph of the Lichen, genus Bulbotrix Hale (Parmeliaceae) Smithsonian Contributions to Botany 32: 1.
- 88.- HALE, M.E. (1976): A monograph of the Lichen, genus Parmelina Hale (Parmeliaceae) Smithsonian Contributions to Botany 33: 1.
- 89.-HALE, M.E. (1976): A monograph of the Lichen, genus Relicina (Parmeliaceae) - Smithsonian Contributions to Botany 26: 1.
- 90.- HALE, M.E. (1976): A monograph of the Lichen genus Pseudoparmelia Lynge (Parmeliaceae) Smithsonian Contributions to Botany 31: 1.
- 91.- HALE, M.E. (1973): Fine Structure of the Cortex in the Lichen Family Parmeliaceae viewed with the Scanning - Electron Microscope - Smithsonian Contributions to Botany 10: 1.
- 92.- IMSHAUG, H.A. (1957): Alpine Lichens of the Western United States and adjacent Canada I - The Microlichen - Bryologist 60: 177.

- 93.- HAWKSWORTH, D.L. (1976): Lichen chemotaxonomy 139-184
In. Lichenology: Progress and Problemas. Edit by
Brown D.H., Hawksworth D.L. and Bailey, R.H.
Academic Press.
- 94.- VICENTE, C., GUERRA, H., VALLE, M.T. (1973): Formas mo-
leculares de glutamato deshidrogenasa, NADP (H)
dependiente, producidas por acción del L-usnato
sódico. Rev. Españ. Fisiol. 29: 301.
- 95.- VICENTE, C., PALASI, M., PILAR, M.E. (1978): Urease
regulation mechanisms in Lobaria pulmonaria (L)
Hoffm. Rev. Bryol. Lichenol. 44: 83.
- 96.- BRODO, I.M., HAWKSWORTH, D.L. (1977): Alectoria and
allied genera in North America. Opera Botanica
42: 1.
- 97.- BRODO, I.M. (1978): Changing concepts regarding chemical
diversity in lichens.- Lichenologist 10: 1.
- 98.- MOSBACK, K., EHRENSVARD, U. (1966): Studies on lichen
enzymes. Part I - Preparation and properties of a
depside hydrolysing esterase and of orsellinic
acid decarboxylase.
Bioche. Biophys. Res. Commun 22: 145.